

**UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS DES
CARCINOGENS 4-DIMETHYLAMINOAZOBENZOL (DAB)**

Friedrich Reichhart

1977

UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS DES
CARCINOGENS 4-DIMETHYLAMINOAZOBENZOL (DAB)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Friedrich REICHHART

MÜNCHEN 1977





1. Berichterstatter : Priv. Doz. Dr. J. Sonnenbichler
2. Berichterstatter : Prof. Dr. H. Wagner

Tag der Einreichung : 14. Oktober 1977

Tag der mündlichen Prüfung : 7. Dezember 1977



Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in München-Martinsried in der Abteilung für Organische Chemie und Spektroskopie unter Anleitung von Herrn Dr. J. Sonnenbichler in der Zeit von April 1972 bis Juli 1975 durchgeführt. Die Diplomarbeit war Teil dieser Arbeit.

Herrn Prof. H. Dannenberg (+) danke ich für das rege Interesse und die Förderung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. J. Sonnenbichler für wertvolle Anregungen und Ratschläge bei der Durchführung der Arbeit.

Meinen Mitarbeitern, Frä. Dr. L. Lüling, Frä. A. Pohl, Frau J. Zetl, Herrn Dr. F. Machicao und Herrn Dr. J. Mattersberger danke ich herzlich für die fruchtbare Kommunikation und zahlreiche kritische Diskussionen.

Frau O. Rösing danke ich für ihre Hilfe und Anleitung bei der Durchführung der Tierversuche.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

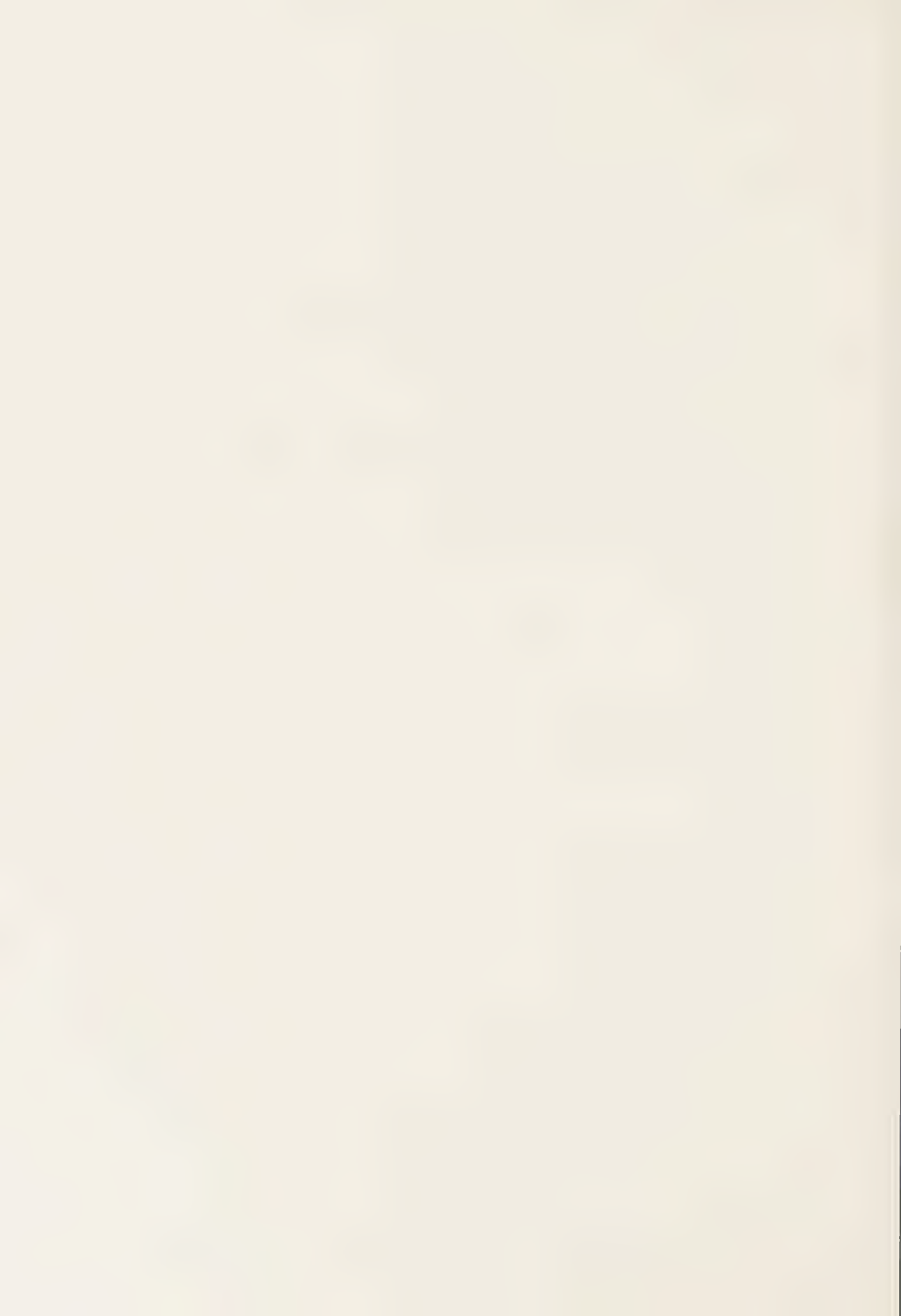
INHALTSVERZEICHNIS

=====

	<u>Seite</u>
1. Einleitung	1
2. Die Synthese der tritiummarkierten Verbindungen 4-Aminoazobenzol (AB) und 4-Dimethyleminoazobenzol (DAB)	4
2.1. Synthesegang	4
2.2. Diskussion	6
3. Aufnahme des Carcinogens DAB und der Referenzsubstanz AB im Erfolgsorgan (Rattenleber)	10
3.1. Aufnahme im Gesamtgewebe	12
3.2. Aufnahme in den Zellkernen	15
3.3. Bindung am Chromatin	17
3.4. Diskussion der Ergebnisse	18
4. Die Bindung der Azofarbstoffe DAB und AB an die chromosomalen Bausteine	20
4.1. Quantitative Trennung von Nukleinsäuren und chromosomalen Proteinen im CsCl-Dichtegradient	21
4.1.1. Trennung von Nukleinsäuren und Proteinen in Abhängigkeit von der CsCl-Molarität	22
4.1.2. Trennung von Nukleinsäuren und Proteinen in Abhängigkeit von der Chromatinkonzentration	24
4.2. Bestimmung der gebundenen Mengen DAB und AB an den chromosomalen Bausteinen	26
4.2.1. Chromosomale Proteine	27

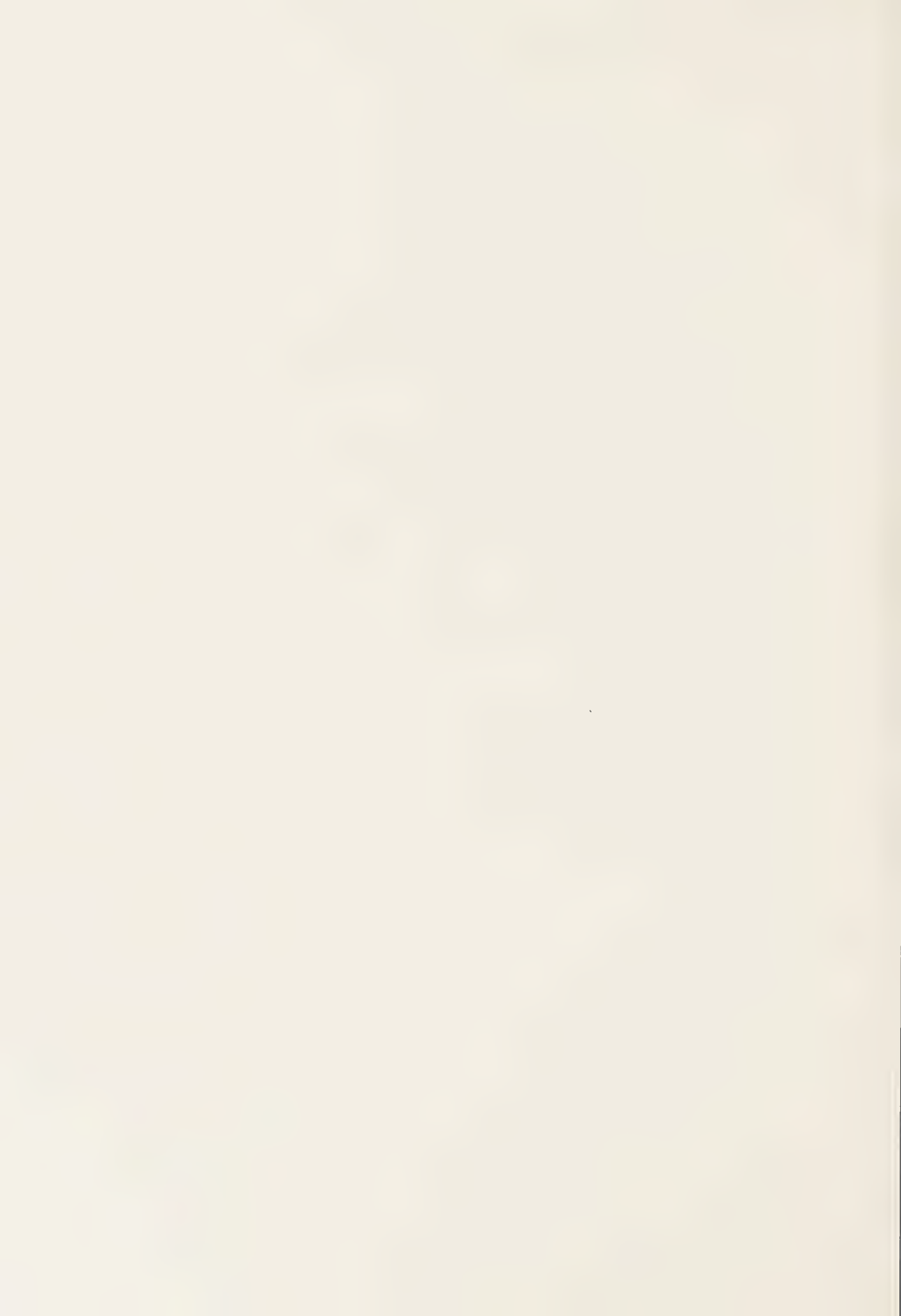
4.2.2.	Nukleinsäuren und DNA	30
4.3.	Diskussion der Ergebnisse	31
5.	Experimenteller Teil	38
5.1.	Synthese der tritiummarkierten Azofarbstoffe 4-Aminoazobenzol (AB) und 4-Dimethylamino- azobenzol (DAB)	38
5.1.1.	Darstellung und Reinigung der Ausgangsprodukte	38
5.1.2.	Synthesegang	38
5.2.	In vivo-Applikation von AB und DAB	40
5.3.	Messung der radioaktiven Proben	41
5.4.	Isolierung von Zellkernen aus Rattenleber	43
5.5.	Präparation von Chromatin	43
5.6.	Ultrazentrifugation von Chromatin	44
5.7.	CsCl-Dichtegradientenzentrifugation	45
5.8.	Isolierung der chromosomalen Proteine und Nukleinsäuren	45
5.9.	Quantitative Analysen	46
5.10.	Polyacrylamidgelelektrophoresen bei pH 2,7.	47
5.11.	Quantitative Bestimmung des Histon- und Nicht- histonanteils im Rattenleberchromatin	48
5.12.	Präparative Trennung von Histonen und Nicht- histonen auf Cellogel	49
5.13.	Trennung von Histonen und Nichthistonen über QAE-Sephadex	50

5.14.	Fraktionierung der Histone Über Biogel P 60	51
5.15.	Reinigung der DNA	52
6.	Zusammenfassung	53
7.	Literaturverzeichnis	57



Abkürzungsverzeichnis

DNA	=	Desoxyribonukleinsäure
RNA	=	Ribonukleinsäure
EDTA	=	Äthylendiamintetraacetat
TEMED	=	N, N, N', N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	=	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
AB	=	4-Aminoazobenzol
DAB	=	4-Dimethylaminoazobenzol
MAB	=	4-Methylaminoazobenzol
QAE-Sephadex	=	Quaternäres Aminoäthyl-Dextran
	=	Diäthyl- (2-hydroxypropyl-) aminoäthyl-Dextran
PPQ	=	2,5-Diphenyloxazol
Omnifluor	=	98 % 2,5-Diphenyloxazol + 2% p-bis-(o-methylstyryl-) benzol
PMSF	=	Phenylmethansulfonylfluorid
Cellosol	=	Äthylenglykolmonoäthyläther
TCA	=	Trichloressigsäure
SDS	=	Natriumdodecylsulfat



1. Einleitung

Seit der Diagnose des Schornsteinfegerkrebses als Berufskrankheit, 1775 durch Pott [1] , der Erkennung des Teeres als krebserzeugender Stoff bei Teerarbeitern, 1874 durch Volkmann [2] , und der ersten experimentellen Krebserzeugung nach Teerpinselung am Kaninchenohr, 1915 durch Yamagiwa und Ichikawa [3, 4] , sammelte sich in den letzten Jahrzehnten eine Fülle von experimentellen Daten zur Carcinogenese. Trotz intensiver Untersuchungen ist der komplexe biologische Mechanismus, der zur malignen Entartung führt, nach wie vor ungeklärt. Eine Vielzahl von Autoren hat hypothetische Modellvorstellungen zum Mechanismus der Carcinogenese diskutiert, die im wesentlichen in zwei Gruppen eingeteilt werden können : Die eine Gruppe, repräsentiert vor allem durch K. H. Bauer [5] , Pitot und Heidelberger [6] , Marquart et al. [7, 8], Wunderlich et al. [9, 10] und Hecker [11, 12, 13], versucht die Krebsentstehung vorwiegend als Folge einer somatischen Mutation, durch exogene Noxen induziert, zu betrachten. Wichtigste Stütze ihres Konzeptes ist der für eine Vielzahl von chemischen Carcinogenen im Tierversuch erbrachte Beweis der Tumorerzeugung. Die zweite Gruppe diskutiert vordergründig den Aspekt der Virusätiologie. Sie wurde vor allem durch Munck [14], Huebner und Todaro [15] und durch Temin [16] repräsentiert. Nach ihnen soll bei der Tumorinduktion latent vorhandenes Genmaterial eines onkogenen Virus aktiviert werden. Dies könnte spontan endogen oder durch exogene Noxen erfolgen. Der zuletzt genannte Aspekt der exogenen Noxen, der vor allem von Temin [16] und Huebner [15] ausführlich erörtert wird, schlägt eine Brücke zu den Verfechtern der zuerst erläuterten Mutationshypothese.

Beide Denkrichtungen basieren auf der gemeinsamen Anschauung, dass der entscheidende Induktionsschritt zur Bildung einer Tumorzelle letztlich am Genom erfolgen muss, unabhängig davon, welche notwendigen Schritte der Tumorinduktion vorgelagert sind. Hauptsächliche Stütze dieser Anschauung ist die heute allgemein anerkannte Tatsache, dass die neoplastischen Eigenschaften einer Tumorzelle hereditär sind. Dies bedeutet, dass bei der Tumorinduktion der Informationsfluss in der Zelle irreversibel gestört wird.

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, die molekularen Vorgänge bei der Tumorentstehung durch exogene Noxen zu erhellen. Dazu sollte die Bindung eines spezifischen Lebercarcinogens, des 4-Dimethylaminobenzols (DAB), an Bausteine des Genommaterials untersucht werden. Um den Weg des Carcinogens in der Zelle detailliert verfolgen und bei den Bindungsstudien möglichst differenzierte Aussagen treffen zu können, musste die Noxe mit einer hohen spezifischen Radioaktivität synthetisiert werden, wobei deren Metabolismus berücksichtigt werden musste. Anschliessend wurde die zeitabhängige Resorption des Carcinogens in der Gesamtzelle und den Zellorganellen untersucht, um einen zeitlich optimalen Bereich für die Bindungsstudien zu ermitteln. Dabei wurde die quantitative Bindung des Carcinogens an das Chromatin und dessen Bausteine, den Nukleinsäuren und den chromosomalen Proteinen untersucht. Um die Relevanz der erhaltenen Ergebnisse abschätzen zu können, wurde parallel zu den Untersuchungen mit dem carcinogen 4-Dimethylaminoazobenzol (DAB), das chemisch sehr verwandte aber carcinogen inaktive 4-Aminoazobenzol (AB) eingesetzt.

Zu der skizzierten Problemstellung liegen bereits eine Reihe von Untersuchungen vor, die jedoch einer kritischen Überprüfung bedürfen, da bei der Fraktionierung des Chromatins ausschliesslich Methoden verwendet wurden, die nach heutigem Kenntnisstand als analytische Verfahren ungeeignet sind [17, 18, 19, 20, 21]. Dazu wird in der Diskussion (Teil 4.3) ausführlich Stellung genommen. In dieser Arbeit musste besonderer Wert auf die exakte Trennung und Reinheit der zu untersuchenden Chromatinfractionen gelegt werden, um exakte Bindungskorrelationen zu erstellen. Hierzu mussten teilweise Trenn-Verfahren modifiziert werden, z.B. die Trennung von Nukleinsäuren und chromosomalen Gesamtproteinen.

2 Die Synthese der tritiummarkierten Verbindungen 4-Aminoazobenzol (AB) und 4-Dimethylaminoazobenzol (DAB).

Bei der Synthese von DAB und AB waren zwei für die weiteren Untersuchungen wichtige Gesichtspunkte zu berücksichtigen :

Aus Vorversuchen und auf Grund von Literaturhinweisen [22, 23, 24] war zu erwarten, dass sehr kleine Mengen der Azofarbstoffe an die chromosomalen Bausteine binden. Deshalb mussten das Carcinogen und die Vergleichssubstanz mit einer möglichst hohen spezifischen Radioaktivität dargestellt werden.

Weiterhin ist bekannt, dass bei der metabolischen Bildung des "ultimalen Carcinogens" [25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37] und dessen anschliessender Bindung an Zellbausteine nur der aminsubstituierte Ringteil des Moleküls in Reaktion tritt (siehe Reaktionsschema II, S. 8), während der monosubstituierte Phenylring unangegriffen bleibt. Damit die Radioaktivität während des Metabolismus nicht "verloren geht", wurde ein Syntheseweg erarbeitet, bei dem die Tritiummarkierung nur am monosubstituierten Phenylring sitzt.

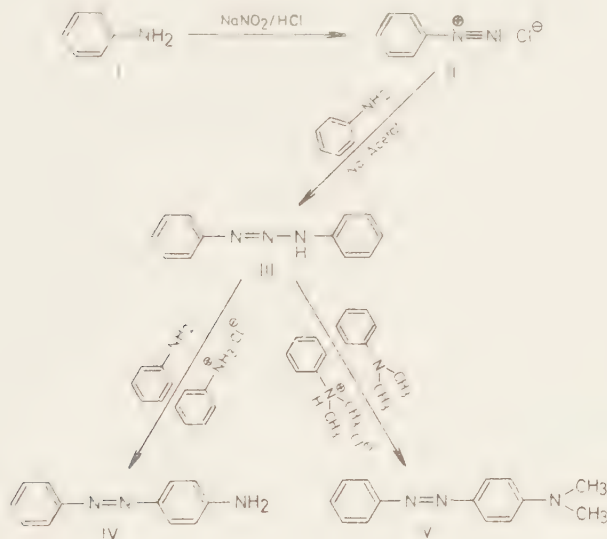
2.1. Synthesegang

Ein den obigen Anforderungen entsprechendes Produkt wird erhalten, wenn man ^3H -(ring-) markiertes Anilin diazotiert und mit nicht markiertem Anilin bzw. Dimethylanilin zum entsprechenden Azofarbstoff (AB bzw. DAB) kuppelt. Der im Reaktionsschema I dargestellte Syntheseweg (siehe Teil 5.1.) berücksichtigt vor allem auch möglichst gute Ausbeuten.

Reaktionsschema I

Syntheseweg zur Darstellung von 4-Aminoazobenzol (IV) bzw.

4-Dimethylaminoazobenzol (V).



³H-(ring-) markiertes Anilin (I) wurde mit einer spezifischen Aktivität von 500 mCi/mMol eingesetzt. Zur Synthese von ca. 100 mCi $\approx$ 0,2 mMol Markierungsprodukt war ein etwa 0,3 molarer Ansatz ($\approx$ 28 mg ³H-Anilin) notwendig. Die Diazotierung erfolgt mit Na NO₂/HCl, wie in Teil 5.1. beschrieben. Das Diazoniumchlorid (II) setzt sich nach Puffern mit Natriumacetat mit überschüssigem nicht markiertem Anilin zum Diazoaminobenzol (III) um. Aus ihm wurde im schwach sauren Medium, nach Zugabe von Aniliniumhydrochlorid bzw. Dimethylaniliniumhydrochlorid das Diazoniumchlorid (II) wieder freigesetzt, welches dann unter wasserfreier

Bedingungen mit grossem Überschuss an Kupplungskomponente (Anilin bzw. Dimethylanilin) zum Azofarbstoff (IV bzw. V) in guter Ausbeute reagiert. Um möglichst hohe Ausbeuten zu erzielen, muss das Zwischenprodukt (III) durch mehrstündige Lyophilisation gut getrocknet werden. Das mitisolierte NaCl blieb im Reaktionskolben, da es den weiteren Reaktionsablauf nicht beeinflusst. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde die Kupplungsreaktion unter trockenem Stickstoff durchgeführt. Nach der Kupplung kann das überschüssige Anilin bzw. Dimethylanilin mit verdünnter Salzsäure gelöst werden, wobei die schwerlöslichen Hydrochloride der Azofarbstoffe zurückbleiben. Nach dem Freisetzen des basischen Azofarbstoffes durch Na_2CO_3 kann dieser direkt auf einer Kieselgelsäule gereinigt werden. Der Identitätsnachweis, die Reinheitsprüfung und die Bestimmung der spezifischen Aktivität erfolgte nach den im Teil 5.1. angegebenen Verfahren. Die Synthesausbeute lag zwischen 66 % (AB) und 72 % (DAB), die Ausbeute an Radioaktivität betrug beim AB 10,9 %, beim DAB 27 %. Damit hatte das AB eine spezifische Aktivität von 82,3 mCi/mMol und das DAB 202,1 mCi/mMol.

2.2. Diskussion

Der Syntheseweg für das Carcinogen und die Referenzsubstanz wurde unter besonderer Berücksichtigung der zwei oben erwähnten Hauptaspekte durchgeführt : Es sollte ein Molekül mit hoher spezifischer Aktivität dargestellt werden, um möglichst differenzierte quantitative Bindungsstudien an chromosomalen Bausteinen durchführen zu können. Beim Metabolismus des applizierten Carcinogens in der Zelle zum sogenannten ultimalen Carcinogen sollte die Radioaktivität nicht durch Abbaureaktionen "verloren gehen", um ein-

deutige quantitative Aussagen zu ermöglichen.

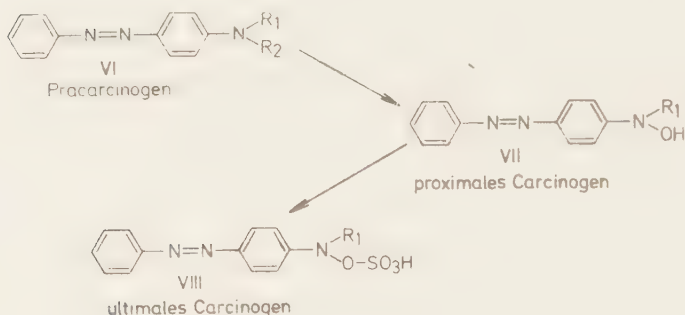
Die Verwendung eines ^{14}C -markierten Moleküls wäre wegen der hohen Zählausbeuten und wegen seiner eindeutigen Aussagen bezüglich des Metabolismus günstiger. Jedoch sind ^{14}C -markierte Ausgangsstoffe nur mit relativ niedriger spezifischer Aktivität ($< 10\text{mCi/mMol}$) erhältlich. Im Teil 4. wird später noch ersichtlich, dass eine spezifische Aktivität in dieser Grössenordnung zu gering ist, um die gebundenen Anteile an den chromosomalen Bausteinen genügend eindeutig zu bestimmen. Die hier durchgeführte Synthese konnte mit einer ^3H -markierten Ausgangsverbindung, dem Anilin, durchgeführt werden, deren spezifische Aktivität genügend hoch war. Bei der Verwendung von ^3H -(-ring-) markiertem Anilin als Ausgangsverbindung befinden sich die ^3H -Atome später in Molekülpositionen, die bei metabolischen Prozessen nicht substituiert werden. An dieser Stelle muss auf den heute vorliegenden Kenntnisstand über den Metabolismus carcinogener aromatischer Amine eingegangen werden, der von einer Vielzahl von Autoren intensiv untersucht wurde. Es sei vor allem auf die Arbeiten von Miller [29, 30], Andersen [35], Baldwin [36], Sato [37], Poirier [25], Scribner [26], Lin [27] und Lotlikar [38] hingewiesen. Man weiss heute, dass carcinogene aromatische Amine nicht in ihrer Ausgangsform, den sogenannten Praecarcinogenen (VI) wirken, sondern zur N-Hydroxyverbindung, dem proximalen Carcinogen (VII) umgewandelt werden (Miller et al. [29], Andersen et al. [35], Baldwin et al. [36] und Sato et al. [37]). Aus den proximalen Carcinogenen (VII) werden anschliessend die N-Hydroxyester, wahrscheinlich die Schwefelsäureester, die ultimalen Carcinogene (VIII),

Reaktionsschema II

Schematische Darstellung der Bildung des ultimalen Carcinogens (VIII) aus dem Praecarcinogen (VI). Die Reaktionsfolgen VI→VII→VIII verlaufen vermutlich über mehrere Zwischenstufen.

DAB : R_1 und $R_2 = \text{CH}_3$

AB : R_1 und $R_2 = \text{H}$



gebildet [Miller et al. [29]]. Die Reaktionsschritte VI→VII→VIII verlaufen wahrscheinlich über mehrere Zwischenstufen - darüber ist jedoch nichts Gesichertes bekannt. Sowohl die N-Hydroxyverbindungen (VII), als auch die N-Hydroxyester (VIII) erwiesen sich bei *in vivo*-Tests als wirksamere Carcinogene als deren Praecarcinogene (VI). Poirier et al. [25] und Lotlikar [38] wiesen die starke elektrophile Reaktivität der N-Hydroxyester (VIII) nach. Diese reagieren meist in o-Stellung zur N-Hydroxyestergruppe, manchmal auch direkt am Stickstoff mit biologischen Bausteinen, Aminosäuren und Proteinen, sowie Nukleinsäuren. Appliziert man Ratten den N-Hydroxybenzoesäure-ester von 4-Methylaminoazobenzol (MAB) *in vivo*, so lassen sich nach enzymatischem Abbau der Leberproteine und Nukleinsäuren dieselben

Substitutionsprodukte isolieren, die auch bei in vitro Tests gefunden wurden - 3-Methylthio-MAB von Scribner [26], 3-(S-homocystein)-MAB und 3-(3'-Tyrosyl)-MAB von Lin [27, 28], sowie N-(guan-8-yl)-MAB von Miller [30]. Diese Befunde führten zu dem Schluss, dass aller Wahrscheinlichkeit nach die N-Hydroxyester als ultimale Carcinogene anzusehen sind. Unter Berücksichtigung des dargestellten Metabolismus und der Substitutionsreaktionen mit Bio-Molekülen wurde bei der Synthese von radioaktivem AB und DAB ein am monosubstituierten Phenylring markiertes Produkt dargestellt, der im Stoffwechsel nicht verändert wird. Dadurch sollten bei den sich anschliessenden Bindungsstudien eindeutige quantitative Aussagen möglich sein. Die erzielte spezifische Aktivität (DAB : 202,1 mCi/mMol und AB : 82,3 mCi/mMol) blieb etwas unterhalb der erwarteten Grössenordnung - vor allem bei der Referenzsubstanz, -vermutlich als Folge radiolytischer Prozesse.

3. Aufnahme des Carcinogens DAB und der Referenzsubstanz

AB im Erfolgsorgan (Rattenleber).

Zur Ermittlung optimaler Applikationsbedingungen wurde im Folgenden der zeitliche Verlauf der Aufnahme der Azofarbstoffe einschliesslich deren Metaboliten im Erfolgsorgan (Rattenleber) bestimmt. Daneben wurde die ebenfalls zeitabhängige Aufnahme der Azofarbstoffe einschliesslich deren Metaboliten in den Zellkernen und schliesslich im Chromatin des Zielorgans untersucht. Zur Vereinfachung werden im Folgenden die Abkürzungen AB und DAB sowohl für die Azofarbstoffe selbst, als auch für deren Metaboliten verwendet. Die Messung der Zeitabhängigkeit der Aufnahme erfolgte nach i.p. Injektion. Die in ihrer Durchführung aufwendigere Injektion in die Schwanzvene der Ratte wurde ebenfalls getestet. Es traten jedoch Probleme durch das als Lösungsmittel für die Azofarbstoffe verwendete 1,2-Propandiol auf, das bei der Ratte nach intravenöser Applikation stark narkotisierend wirkt. Zur Messung des zeitabhängigen Verlaufs wurden jeweils an zwölf Ratten in einer Serie je 50 $\mu\text{Ci} \approx 2,5 \mu\text{Mol}$ ^3H -AB bzw. ^3H -DAB i.p. appliziert. Nach verschiedenen Zeitpunkten von 0,5 - 2,5 Std. erfolgte die Aufarbeitung. Gemessen wurde die in der Leber, den Zellkernen und dem Chromatin vorhandene Radioaktivität als Mass für die Menge an DAB und AB. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1, 2 und 3 zusammengefasst und in den Diagrammen (Fig. 1, 2 und 3) graphisch dargestellt.

Tabelle 1. Zeitlicher Verlauf der Resorption von ^3H -AB und Metaboliten und ^3H -DAB und Metaboliten im Rattenlebergewebe. Alle Werte wurden auf jeweils 10 mg Lebergewicht (Frischgewicht) bezogen. Angegeben sind die Mittelwerte aus mindestens vier Einzelbestimmungen. Δ_{max} = maximale Abweichung eines Einzelwertes vom Mittelwert.

Zeitpunkt der Aufarbeitung nach i.p.-Applikation (Std.)	p-Mol ^3H -DAB (-Metabolit)		p-Mol ^3H -AB (-Metabolit)	
		Δ_{max} (%)		Δ_{max} (%)
0,5	$125 \pm 5,8$ *	14,1	$119 \pm 7,3$ *	20,1
1	$117 \pm 7,1$	12,2	$115 \pm 4,8$	16,5
2	$113 \pm 5,0$	18,6	$117 \pm 7,9$	17,1
3	$108 \pm 3,6$	15,6	$105 \pm 3,0$	16,2
3,5	$146 \pm 6,2$	15,2	$87 \pm 5,2$	17,2
4	$150 \pm 8,7$	12,8	$82 \pm 5,3$	22,0
4,5	$113 \pm 7,4$	13,5	$77 \pm 4,7$	18,2
5	$111 \pm 5,6$	15,8	$71 \pm 6,1$	22,5
6	$111 \pm 3,5$	18,0	$52 \pm 4,3$	13,1
6	$111 \pm 4,8$	20,3	$43 \pm 5,0$	13,3
12	$51 \pm 3,1$	17,6	$38 \pm 3,3$	14,4
24	$31 \pm 2,6$	19,5	$21 \pm 2,8$	23,8

*) Standardabweichung: $s = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n - 1}}$

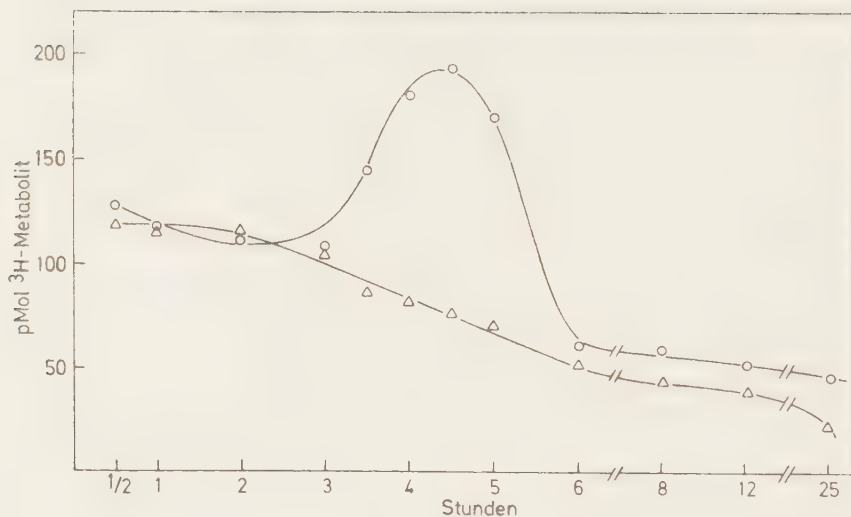


Fig. 1 Graphische Darstellung der zeitabhängigen Resorption von AB (Δ - Δ - Δ) und DAB (o-o-o) (einschliesslich Metaboliten) im Rattenlebergewebe.

3.1. Aufnahme im Gesamtgewebe

Aus der Tabelle 1. und Fig. 1 ist der zeitliche Verlauf der Resorption im gesamten Erfolgsorgan ersichtlich, wobei sämtliche angegebenen Messwerte auf 10 mg Lebergewicht bezogen wurden.

In Fig. 1 zeigt die Kurve für das carcinogen inaktive AB eine nahezu lineare Abnahme der Radioaktivität bei zunehmender Zeit, nachdem bereits nach 0,5 Std. eine maximale Konzentration des AB erreicht wurde. Im Gegensatz dazu verläuft die Kurve für das Carcinogen DAB deutlich unterschiedlich. Nach einem kurzen steilen Anstieg fällt die Kurve von der ersten bis zur dritten Stunde ganz schwach ab. Dies bedeutet, dass während dieses Zeitintervalls der resorbierte Anteil an DAB im Lebergewebe abnimmt. Anschliessend erfolgt ein erneuter Anstieg mit einem Maximum zwischen der vierten und fünften Stunde. Das heisst, dass in diesem Zeitintervall der resorbierte Anteil an DAB im Gewebe stark zunimmt. Der Höchstwert zwischen der vierten und fünften Stunde beträgt ungefähr knapp das Doppelte des ersten Maximums (nach 0,5 Std.). Anschliessend nimmt der resorbierte Anteil an DAB wieder stark ab. Zuletzt verläuft die Kurve wieder flacher und entspricht in ihrer Neigung dem Verlauf der AB-Kurve.

Tabelle 2. Zeitlicher Verlauf der Konzentration von ^3H -AB und Metaboliten und ^3H -DAB und Metaboliten in den Rattenleberkernen. Alle Werte wurden auf jeweils 10^8 -Kerne bezogen. Angegeben sind die Mittelwerte aus mindestens vier Einzelbestimmungen.

Δmax = maximale Abweichung eines Einzelwertes vom Mittelwert.

Zeitpunkt der Auf- beutung nach i.p.-Applikation (Std.)	p-Mol ^3H -DAB (-Metabolit)		p-Mol ^3H -AB (-Metabolit)	
		Δmax (%)		Δmax (%)
0,5	69,8 $\pm$ 4,8*	14,0	60,1 $\pm$ 5,6*	18,7
1	63,2 $\pm$ 5,2	14,4	54,9 $\pm$ 4,8	17,3
2	59,6 $\pm$ 3,7	12,7	56,0 $\pm$ 5,4	19,3
3	57,0 $\pm$ 3,1	11,0	51,0 $\pm$ 6,3	21,0
3,5	68,3 $\pm$ 2,3	14,0	49,7 $\pm$ 4,4	18,9
4	67,3 $\pm$ 5,9	14,5	45,3 $\pm$ 2,5	18,1
4,5	99,1 $\pm$ 6,3	15,3	47,2 $\pm$ 3,6	16,8
5	102 $\pm$ 7,8	16,2	37,4 $\pm$ 4,1	13,3
6	32,5 $\pm$ 2,3	16,3	16,8 $\pm$ 1,8	12,5
8	11,3 $\pm$ 1,6	20,3	7,3 $\pm$ 0,7	17,8
12	10,8 $\pm$ 0,9	17,6	4,9 $\pm$ 0,5	24,5
25	8,3 $\pm$ 1,1	24,1	2,8 $\pm$ 0,3	21,2

* Standardabweichungen

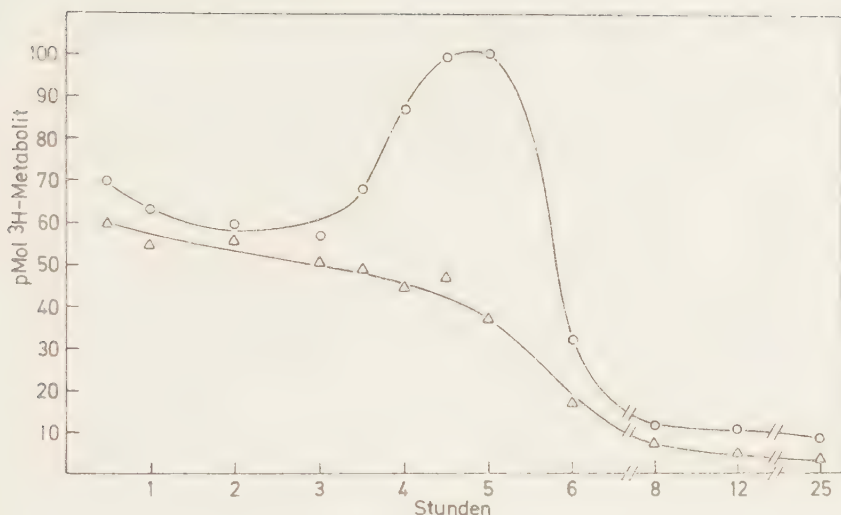


Fig. 2 Graphische Darstellung der zeitabhängigen Konzentration von AB (Δ-Δ-Δ) und DAB (o-o-o) und Metaboliten in den Rattenleberkernen.

3.2. Aufnahme in den Zellkernen

Tabelle 2. und Fig. 2 zeigen den zeitlichen Verlauf der Resorption in den Zellkernen des Erfolgsorgans, wobei sämtliche angegebenen Messwerte auf 10^8 Kerne bezogen wurden. Das Bild zeigt einen der Rattenleber ganz analogen Verlauf. Die Kurve für das AB verläuft wieder nahezu linear. Auch bei den Zellkernen nimmt der resorbierte Anteil an AB mit zunehmender Zeit kontinuierlich ab. Im Gegensatz dazu zeigt die Kurve für das Carcinogen DAB auch hier einen deutlich unterschiedlichen Verlauf mit starkem Anstieg mit Maximum zwischen der vierten und fünften Stunde und danach starkem Abfall.

Auch für das restliche Zeitintervall gilt die Analogie zu dem beim Gesamtgewebe Beschriebenen : Die Kurve verläuft wieder flacher und entspricht in ihrer Neigung der AB-Kurve. Der resorbierte Anteil an DAB nimmt langsam ab.

Tabelle 3. Zeitabhängigkeit der gebundenen Anteile von $^3\text{H-AB}$ (-Metabolit) und $^3\text{H-DAB}$ (-Metabolit) im Rattenleberchromatin. Alle Werte wurden auf Jeweils 1 mg DNA bezogen. Angegeben sind die Mittelwerte aus mindestens vier Einzelbestimmungen.
 Δmax = maximale Abweichung eines Einzelwertes vom Mittelwert.

Zeitpunkt der Aufarbeitung nach i.p.-Applikation (Std.)	p-Mol $^3\text{H-DAB}$ (-Metabolit)		p-Mol $^3\text{H-AB}$ (-Metabolit)	
		Δmax (%)		Δmax (%)
0,5	$33,2 \pm 3,7$ *)	14,5	$27,0 \pm 1,8$ *)	15,9
1	$32,9 \pm 1,8$	15,5	$26,3 \pm 3,1$	15,2
2	$23,7 \pm 2,3$	14,5	$17,8 \pm 1,5$	20,2
3	$25,4 \pm 2,0$	16,5	$18,4 \pm 1,2$	17,9
3,5	$30,8 \pm 2,9$	15,3	$19,2 \pm 3,5$	16,1
4	$39,9 \pm 4,8$	12,3	$13,5 \pm 1,6$	20,0
4,5	$42,6 \pm 2,1$	12,0	$14,8 \pm 0,8$	20,1
5	$38,3 \pm 2,5$	9,9	$7,2 \pm 0,9$	25,0
6	$8,7 \pm 1,4$	24,0	$6,3 \pm 0,4$	23,8
8	$8,2 \pm 0,9$	20,8	$4,1 \pm 0,7$	21,9
12	$7,1 \pm 0,3$	21,1	$3,6 \pm 0,2$	22,2
25	$5,4 \pm 0,6$	22,2	$2,5 \pm 0,3$	20,0

*) Standardabweichung

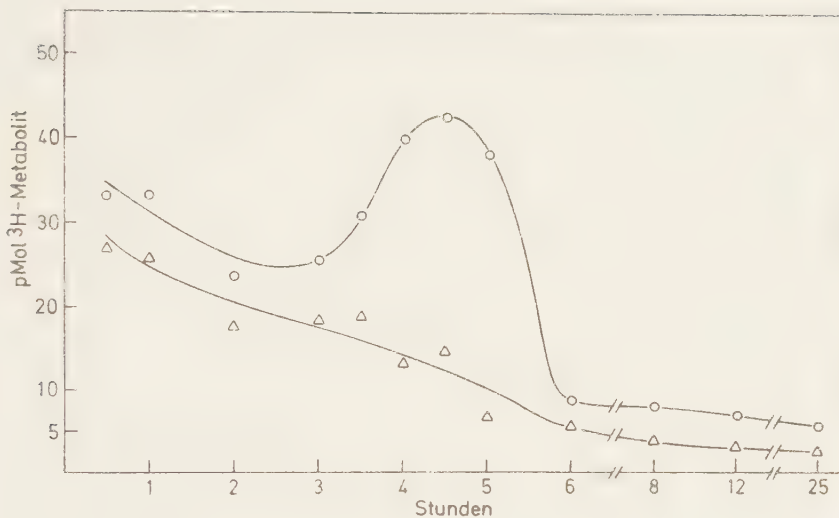


Fig. 3 Graphische Darstellung der zeitabhängigen Bindung von AB (Δ - Δ - Δ) und DAB (o-o-o) und Metaboliten im Rattenleberchromatin.

3.3. Bindung am Chromatin

Tabelle 3. und Fig. 3. zeigen schliesslich den zeitlichen Verlauf der Bindung des AB und DAB an das Chromatin, wobei sämtliche angegebenen Messwerte auf 1 mg DNA bezogen wurden. Auch hier bietet sich ein analoges Bild wie beim Lebergewebe und den Zellkernen. Der gebundene Anteil von AB am Chromatin nimmt auch hier mit zunehmender Zeit kontinuierlich ab. Im Gegensatz dazu zeigt die Kurve für das Carcinogen DAB den schon bekannten diskontinuierlichen Verlauf: schwach absteigende Tendenz bis zur dritten Stunde, anschliessend starker Anstieg mit Maximum zwischen vierter und fünfter Stunde und danach starker Abfall. Auch für das restliche Zeitintervall gilt die Analogie zu dem beim Gesamtgewebe und den Zellkernen Beschriebenen:

Die Kurve verläuft wieder flacher, sie entspricht in ihrer Neigung der AB-Kurve. Der gebundene Anteil an DAB nimmt mit zunehmender Zeit langsam ab.

3.4. Diskussion der Ergebnisse

Die durchgeführten Untersuchungen geben ein grobes quantitatives Bild über den zeitlichen Verlauf der Aufnahme im Erfolgsorgan. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass die Einzelmessungen relativ grossen Schwankungen unterliegen - bis zu 25 % Abweichungen vom Mittelwert, siehe Tabellen 1.2. und 3. Obwohl bei der i.p.-Applikation die Körpergewichte der Einzeltiere möglichst konstant gehalten wurden ($120 \text{ g} \pm 7 \%$) unterlagen die Gewichte der Leber der Einzeltiere schon Schwankungen von 18 %. Daraus ergibt sich unvermeidlich ein unterschiedliches Angebot von AB- und DAB (-Metabolit) pro g Leber (und dadurch auch an die Zellkerne und das Chromatin) der Einzeltiere, denn die Menge des applizierten AB und DAB wurde konstant gehalten ($2,5 \text{ } \mu\text{Mol}$ pro Tier).

Eine Verfeinerung der Messdaten könnte nur durch eine grosse Anzahl von Versuchsserien erzielt werden. Derartige umfangreiche Untersuchungen hätten aber den Rahmen dieser Arbeit gesprengt. Überdies erscheinen die hier ermittelten Maxima so signifikant, dass sie durchaus geeignet sind, die Rahmenbedingungen, d.h. den zeitlich optimalen Bereich für die folgenden differenzierteren quantitativen Bindungsstudien zu ermitteln.

Bei allen DAB-Kurven treten die Maxima zwischen der vierten und fünften Stunde so deutlich auf, dass dieser als Zeitpunkt für die weiteren Untersuchungen ebenfalls maximale Bindungsanteile erwarten lässt. Man kann als Arbeitshypothese annehmen, dass der zeitabhängige Verlauf der Bindung an die Nukleinsäuren und an die chromosomalen Proteine sich nicht wesentlich von denen des unzerlegten Chromatins unterscheidet. Daher wurde für die weiteren Versuche viereinhalb Stunden nach Applikation der radioaktiv markierten Verbindungen aufgearbeitet.

Beim Betrachten der in Fig. 1., 2. und 3. dargestellten Kurven fällt die Analogie zur Resorption von Steroidhormonen im Erfolgsorgan auf. Auch bei diesen lässt sich ein diskontinuierlicher zeitabhängiger Verlauf der Resorption im Zielgewebe mit einem Maximum zwischen der zweiten und dritten Stunde feststellen (Jensen [39, 40]), was als charakteristisch für das Vorliegen spezifischer Rezeptoren gedeutet wird. Die strukturelle Ähnlichkeit vieler carcinogener aromatischer Kohlenwasserstoffe mit Steroidhormonen liessen Yang [41], Huggins [42], Dannerberg [43, 44, 45] et al. vermuten, dass Parallelen zwischen den Wirkorten von Steroidhormonen und Carcinogenen bestehen könnten. Diese Gesichtspunkte erlauben mit aller Vorsicht die Hypothese, dass möglicherweise der cancerogene Aromat mit spezifischen Bindungsorten für Steroidhormone in konkurrierende Wechselwirkung treten könnte. Bei den in diesem Abschnitt geschilderten Ergebnissen muss aber nochmals betont werden, dass mit dem angewendeten Verfahren zur Messung der AB- und DAB-Konzentrationen auch sämtliche Stoffwechselprodukte der beiden Azofarbstoffe miterfasst wurden. Deshalb können die hier diskutierten Parallelen zwischen Carcinogenen und Steroidhormonen bislang nur hypothetisch sein.

4. Die Bindung der Azofarbstoffe DAB und AB an die chromosomalen Bausteine

Unter dem Aspekt der Mutationshypothese ist das Chromatin als potentieller Zielort für Carcinogene anzusehen. Diese könnten eine Veränderung der genetischen Information bewirken, welche auf dem Weg der Replikation an eine Tochterzelle weitergegeben und zur Tumorgenese führen würde. Dabei kann entweder die DNA als Träger der genetischen Information durch Reaktion mit Carcinogenen in ihrer Struktur verändert werden, oder die chromosomalen Proteine, die bei der Informationsvermittlung eine zentrale Rolle übernehmen [46], müssten nach Reaktion mit Carcinogenen in ihrer Funktion verändert werden, was sekundär die Fehlsteuerung der Replikation (und Transkription) bewirken könnte.

Eine Reihe von Autoren hat sich bereits mit dem Problem der Bindung von Carcinogenen an chromosomale Bausteine befasst [22, 23, 24, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59]. Die dabei angewandten Methoden der Chromatinfractionierung - vor allem der Isolierung der chromosomalen Proteine, die gleichzeitig eine Trennung von Histonen und Nichthistonen einschloss - sind aber nach heutigem Kenntnisstand keine quantitativen Trennverfahren (Sonnenbichler, Bornkamm und Nobis [17, 18, 19, 20, 21]).

Auf diese Autoren wird in der sich anschliessenden Diskussion näher eingegangen. In dieser Arbeit sollte besonders Wert darauf gelegt werden, alle Bindungsstudien an chromosomale Bausteine mit Methoden durchzuführen, die eine exakte Analyse der isolierten Bausteine und eine quantitative Bestimmung der gebundenen Anteile von DAB, AB oder deren Metaboliten ermöglichen. Dabei konnte im wesentlichen auf die modernen Methoden der Chromatinfractionierung zurückgegriffen werden (Teil 5.4. bis einschliesslich 5.15.). Ergänzend musste jedoch ein neues Verfahren zur Trennung von Nukleinsäuren und chromosomalen Proteinen ausgearbeitet werden.

4.1. Quantitative Trennung von Nukleinsäuren und chromosomalen Proteinen im CsCl-Dichtegradient :

Es gibt eine Reihe von Methoden um chromosomale Proteine von den Nukleinsäuren zu trennen. Verfahren, durch die beide Anteile einerseits quantitativ getrennt, andererseits so isoliert werden, dass sie noch für weitere Untersuchungen zugänglich bleiben, sind begrenzt. Eine Möglichkeit zur Fraktionierung von Nukleinsäuren und chromosomalen Proteinen besteht in der Ultrazentrifugation von Chromatin bei hohen Ionenstärken ($>1M$) und Harnstoffkonzentrationen ($>5M$). [60, 61, 62, 63, 64, 65]. Dabei dissoziiert das Chromatin in Proteine und Nukleinsäuren; letztere lassen sich bei der Ultrazentrifugation relativ leicht sedimentieren. Allerdings liefert die Ultrazentrifugation in 2 M NaCl und 5 M Harnstoff ein Nukleinsäuresediment, das noch 10 - 15 %

Proteinanteil enthält. Auch nach einer Wiederholung der Ultrazentrifugation verbleiben noch ca. 2 - 5 % Protein an den Nukleinsäuren. Dieses Verfahren sollte nun so modifiziert werden, dass die Trennung Protein-Nukleinsäure quantitativ verläuft.

4.1.1. Trennung von Nukleinsäuren und Proteinen in Abhängigkeit von der CsCl-Molarität

Durch CsCl - oder Cs_2SO_4 - Dichtegradientenzentrifugation lassen sich biologische Makromoleküle auf Grund ihrer unterschiedlichen Moleküldichte trennen [66, 67]. Dieses Prinzip sollte auch bei dissoziiertem Chromatin die quantitative Trennung von Nukleinsäuren und chromosomalen Proteinen liefern.

In einer Versuchsserie mit unterschiedlichen CsCl-Molaritäten (zwischen 1 M und 2,5 M CsCl) und in Anwesenheit von jeweils 5 M Harnstoff wurde Chromatin 70 Std. bei 350.000 g zentrifugiert. Die Chromatinkonzentration wurde konstant gehalten und betrug 175 µg/ml DNA und 350 µg/ml Protein. Nach der Ultrazentrifugation wurde fraktioniert und der Protein-, DNA- und RNA-Gehalt jeder Fraktion bestimmt. Die graphische Darstellung in Fig. 4a zeigt, dass bei einer CsCl-Molarität von 1,5 M und darunter die obere Fraktion kein Protein enthält. Ein Maximum der Proteinkonzentration liegt ungefähr in der Mitte des Gradienten. Die unteren Fraktionen enthalten ebenfalls noch beträchtliche Proteinmengen und auch im Nukleinsäuresediment sind noch ca. 2 - 3,5 % Protein nachzuweisen. Bei CsCl-Molaritäten von

1,5 M und kleiner ist demnach im Dichtegradienten keine quantitative Trennung von Nukleinsäuren und Proteinen möglich.

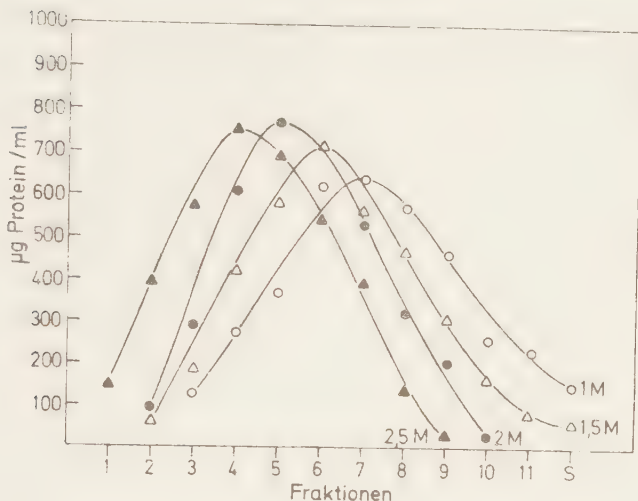


Fig. 4a Auftrennung von Chromatin in Nukleinsäuren und Protein im CsCl-Dichtegradienten bei verschiedenen CsCl-Molaritäten und 5M Harnstoff. Die Chromatinkonzentration betrug jeweils 175 µg/ml (bez. auf DNA). Zentrifugation : 70 Std. bei 350.000 g im SW 60-Rotor (Christ). Der Gradient wurde von oben her in 0,5 ml-Fractionen entnommen, S bedeutet Sediment.

o-o-o 1 M CsCl ●-●-● 2 M CsCl
 Δ-Δ-Δ 1,5 M CsCl ▲-▲-▲ 2,5 CsCl

Bei einer CsCl-Molarität von 2,5 M CsCl und höher enthält die oberste Fraktion schon Protein. Da sich diese teilweise an der Oberfläche des Gradienten befinden, werden die Proteine dabei denaturiert, so dass sie nicht mehr in Lösung gebracht werden können - was für weitere Untersuchungen notwendig wäre.

In diesem Konzentrationsbereich steigt der Proteingehalt anschliessend ebenfalls steil an, das Maximum liegt in der oberen Hälfte des Gradienten, fällt fast ebenso steil ab, wodurch die nukleinsäurehaltigen Fraktionen proteinfrei werden. Die Trennung Nukleinsäure - Protein verläuft also bei CsCl-Molaritäten von 2,5 M und grösser quantitativ. Wegen der Obeflächendenaturierung in der obersten Fraktion ist dieser Molaritätsbereich dennoch unzweckmässig für die beabsichtigte Trennung. Am geeignetsten für die Trennung erwies sich der Bereich von 2 M CsCl. Die oberste Fraktion bleibt frei von Protein. Der Proteinanteil erreicht seinen Höchstwert in der Mitte des Gradienten und fällt dann steil ab, die untersten Fraktionen und das Sediment (Nukleinsäuren) enthalten kein Protein. In diesem Molaritätsbereich erfolgt noch eine quantitative Trennung von Protein und Nukleinsäuren.

4.1.2. Trennung von Nukleinsäuren und chromosomalen Proteinen in Abhängigkeit von der Chromatinkonzentration :

Die Trennschärfe des CsCl-Gradienten ist nicht nur von der Ausgangskonzentration an CsCl, sondern auch von der des eingesetzten Chromatins abhängig. Dies wurde in einer zweiten Versuchsserie ermittelt, bei der unterschiedliche Chromatinkonzentrationen auf ihren Trennverlauf bei konstanten Salz- und Harnstoffkonzentrationen (2M CsCl, 5 M-Harnstoff) untersucht wurden. Die Ergebnisse sind in Fig. 4b zusammengestellt. Aus der graphischen Darstellung wird ersichtlich, dass bei einer Chromatinkonzentration von 225 µg/ml,

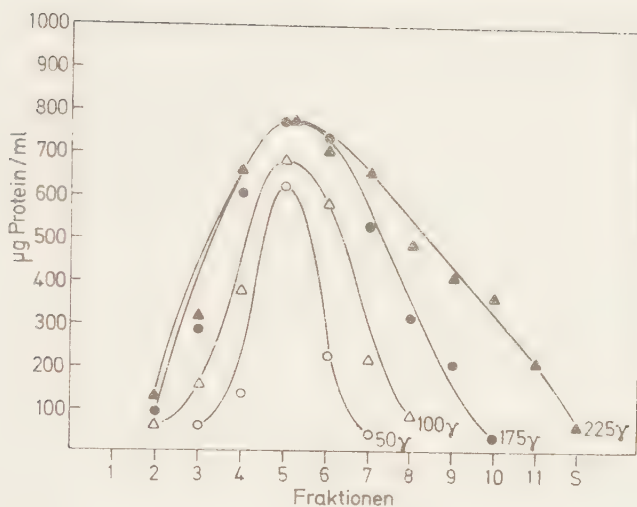


Fig. 4b Auftrennung von Chromatin in Nukleinsäuren und Protein im CsCl-Dichtegradienten (2 M CsCl, 5 M Harnstoff) bei unterschiedlichen Chromatinkonzentrationen. Zentrifugation, Gradientenentnahme und Proteinbestimmung wie bei Fig. 4a.

o-o-o 50 µg/ml (DNA) ●-●-● 175 µg/ml
 Δ-Δ-Δ 100 µg/ml ▲-▲-▲ 225 µg/ml

(bezogen auf DNA) und grösser, der Proteingehalt über alle Fraktionen (mit Ausnahme der obersten) verteilt ist, wobei das Maximum der Proteinkonzentration ungefähr in der Mitte des Gradienten liegt. In den unteren Fraktionen fällt der Proteingehalt wieder ab, jedoch sind auch im Nukleinsäuresediment noch ca. 3,5 % Proteinanteil (bez. auf DNA) nachzuweisen. Die Trennung Protein-Nukleinsäuren verläuft in diesem Konzentrationsbereich also nicht quantitativ.

Bei einer Chromatinkonzentration von 175 µg/ml verläuft der Gradient zunächst ähnlich. Die obere Fraktion enthält kein Protein, anschliessend steigt der Proteingehalt rasch an und erreicht seinen Höchstwert wieder in der Mitte des Gradienten. Danach fällt jedoch der Proteingehalt rasch ab, die vorletzte Fraktion und das Sediment (Nukleinsäuren) enthalten kein Protein. Die Trennung Protein-Nukleinsäuren verläuft in diesem Konzentrationsbereich quantitativ. Reduziert man die Chromatinkonzentration auf 100 µg/ml bzw. 50 µg/ml (und kleiner), so wird die Anzahl an Fraktionen, die noch Proteine enthalten, immer kleiner. Die Proteinbandung wird bei abnehmender Chromatinkonzentration folglich immer schärfer, die Trennung Protein-Nukleinsäuren verläuft quantitativ, liefert aber wenig Material.

4.2. Bestimmung der gebundenen Mengen DAB und AB an den chromosomalen Bausteinen

Auf der Basis der beschriebenen Trennmethode im CsCl-Dichtegradient konnten die quantitativen Bindungsstudien des Carcinogens DAB und des nicht carcinogenen AB an chromosomale Bausteine durchgeführt werden. Dabei wurde im Bereich der in Teil 3. ermittelten optimalen Bedingungen für eine maximale Resorption gearbeitet. Die i.p.-Applikation an die Ratte (500 µCi $\hat{=}$ 2,45 µMol DAB, bzw. 200 µCi $\hat{=}$ 2,45 µMol AB) erfolgte viereinhalb Stunden vor der Aufarbeitung. Das DAB und AB war zur Injektion in 1,2-Propan-diol gelöst. Bei der Aufarbeitung wurden aus der Rattenleber

Tabelle 4. Übersicht über die Bindungsanteile von ^3H -DAB und ^3H -AB (Metaboliten) an die Bausteine des Chromatins. Zur vollständigen Übersicht sind auch die zugehörigen Werte für Lebergewebe, Zellkerne und Chromatin aufgeführt. Die Werte sind angegeben in pMol bezogen auf : 10 mg Lebergewebe, 10^8 Kerne, 1 mg DNA (Chromatin), 1 mg Protein bzw. Nukleinsäuren. Alle Werte sind Mittelwerte aus mindestens vier Einzelbestimmungen.

Gewebebraktion	p-Mol ^3H -DAB (-Metabolit)		p-Mol ^3H -AB (-Metabolit)	
	Einfach-applikation	Zweifach- *) applikation	Einfach-applikation	Zweifach- *) applikation
Lebergesamtgewebe	193 $\pm$ 7,4**)	374 $\pm$ 23**)	77 $\pm$ 4,7**)	178 $\pm$ 13**)
- kerne	99,1 $\pm$ 6,3	117 $\pm$ 6,8	47,2 $\pm$ 3,6	58,0 $\pm$ 3,9
Chromatin	42,6 $\pm$ 2,1	48,2 $\pm$ 3,9	14,8 $\pm$ 0,8	19,1 $\pm$ 1,2
chromosomale Gesamtproteine	11,7 $\pm$ 0,6	18,3 $\pm$ 0,7	5,8 $\pm$ 0,5	8,9 $\pm$ 0,3
Histone	<0,1	<0,1	<0,25	<0,25
Nichthistone	12,4 $\pm$ 0,8	19,3 $\pm$ 1,2	<0,25	<0,25
Nukleinsäuren	3,9 $\pm$ 0,1	5,7 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,2
DNA	<0,1	<0,1	<0,25	<0,25

*) Zur Kontrolle wurden auch Versuchsreihen mit einer höheren Anzahl an Mehrfachinjektionen durchgeführt - maximal wurde an drei Tagen vor der Aufarbeitung dreimal täglich appliziert. Es ergab sich jedoch keine deutliche Steigerung des Bindungsanteils von DAB und AB an die chromosomalen Proteine und Nukleinsäuren.

***) Standardabweichung (siehe Seite 11)

Zellkerne isoliert, anschliessend Chromatin präpariert und die Nukleinsäuren von den chromosomalen Proteinen im CsCl-Dichtegradient abgetrennt. Die chromosomalen Proteine wurden mittels der präparativen Cellogelelektrophorese in die Nihthistonfraktion und verschiedene Histonfraktionen aufgetrennt. Die Bindungsanteile an DAB und AB wurden durch Messung des Anteils an Radioaktivität an den einzelnen Fraktionen bestimmt. In einer parallelen Versuchsserie wurden die Bindungsanteile nach zweimaliger Applikation ermittelt (jeweils zweimal $500 \mu\text{Ci} \approx 2,45 \mu\text{Mol}$ DAB, bzw. zweimal $200 \mu\text{Ci} \approx 2,45 \text{ Mol}$ AB). Die erste Applikation erfolgte 15 Stunden (abends), die zweite viereinhalb Stunden (morgens) vor der Aufarbeitung. Alle ermittelten Werte sind in der Tabelle 4. zusammengefasst, wobei die Werte der Einfachapplikation denen der Zweifachapplikation gegenübergestellt wurden. Der Vollständigkeit wegen sind auch die zugehörigen Werte für Lebergewebe, Zellkerne und Chromatin mitaufgeführt.

4.2.1. Chromosomale Proteine :

Beim Betrachten der an die Gesamtproteine gebundenen Mengen DAB und AB zeigt das Carcinogen DAB eine erhöhte Bindungstendenz gegenüber dem nichtcarcinogenen AB. Alle DAB-Werte (11,7 bzw. 18,3 pMol pro mg Protein) liegen etwa doppelt so hoch wie die AB-Werte (5,8 bzw. 8,9 pMol pro mg Protein). Weiter ist aus der Tabelle ersichtlich, dass der Wert nach Zweifachapplikation beim DAB etwa das Eineinhalbfache des Wertes nach Einfachapplikation beträgt. Dieses Verhältnis findet sich allerdings auch beim AB.

Die Relationen (Verhältnis der Bindungsanteile DAB : AB und Verhältnis der Bindungsanteile nach Zweifach- und Einfachapplikation) entsprechen in ihrer Grössenordnung dem Bild, das auch bei Lebergewebe, Zellkernen und Chromatin zu sehen ist. Werden die Gesamtproteine elektrophoretisch in Histone und Nichthistone aufgetrennt, so tritt bemerkenswerterweise eine deutliche Differenzierung auf. Alle für die Histone ermittelten Werte des Bindungsanteils liegen sowohl beim DAB als auch beim AB so niedrig, dass sie nicht mehr deutlich vom "background" unterschieden werden konnten. (Alle cpm-Werte, die unter 100 lagen, wurden nicht mehr in dpm- und p-Mol-Werte umgerechnet). Da aus methodischen Gründen nicht mehr als 10 mg Protein zur Messung eingesetzt werden konnten, ergeben sich die in der Tabelle angegebenen Messgrenzen von 0,1 pMol DAB und 0,25 pMol AB. ¹⁾

Die Bindungsanteile an den Nichthistonen zeigen ein völlig anderes Bild. Man findet hier einen signifikanten Unterschied zwischen dem Carcinogen DAB und dem Nichtcarcinogen AB. Während für das AB kein oberhalb der Messgrenze liegender Wert zu ermitteln ist, lässt sich für das DAB - ganz im Unterschied zu den Histonen - sowohl nach Einfach- als auch nach Zweifachapplikation ein deutlicher Bindungsanteil nachweisen (12,4 bzw. 19,3 pMol pro mg Protein), wobei der Anteil nach zweimaliger Applikation etwa eineinhalbmal so hoch wie nach einmaliger Applikation liegt. Das Ausmass der Bindung von DAB an die Nichthistonproteine beträgt folglich mindestens das Fünffache (nach Einfachinjektion) bzw. das

1) Die spezifische Aktivität von DAB war zweieinhalbmal so hoch wie die von AB (Teil 5.1.2.).

Achzigfache (nach Zweifachinjektion) des für das AB maximal nachweisbaren Wertes. Diese Anteile bleiben auch nach mehrmaliger Extraktion der Proteine mit Aceton konstant. Trennt man die Proteine über QAE-Sephadex [60, 68] in Histone und Nicht-histone, so findet man ganz analoge Ergebnisse, obwohl beim Anwenden dieser Methode die Nichthistonfraktion mit geringen Histonteilen verunreinigt ist. Auf Grund der vorangegangenen Isolierungsschritte : Dissoziation von Chromatin in hohen Ionenstärken und Harnstoffkonzentrationen, Acetonfällung der Proteine und mehrmalige Extraktion, sowie der elektrophoretischen Trennung in Histone und Nichthistone kann eine kovalente Bindung von carcinogenem DAB (-Metabolit) an die Nichthistone angenommen werden.

4.2.2. Nukleinsäuren und DNA

Die für die Bindungsanteile von DAB und AB an den Nukleinsäuren gefundenen Werte zeigen ein qualitativ ähnliches Bild, wie es bei den chromosomalen Gesamtproteinen zu finden ist. Die Werte der Versuchsreihe mit zweimaliger Applikation liegen deutlich über denen der Versuchsreihe mit Einfachapplikation. Ebenso ist aus der Tabelle 4. ersichtlich, dass die DAB-Bindungsanteile mindestens doppelt so hoch (3,3 bzw. 5,6 pMol pro mg Nukleinsäuren) wie die für das AB ermittelten liegen (1,6 bzw. 2,1 pMol). Allerdings liess sich nach der Isolierung der DNA aus der Nukleinsäurefraktion mit anschliessender Reinigung durch Alkoholfällung an dieser keine über der Messgrenze liegende Bindung von DAB und AB nachweisen.

4.3. Diskussion der Ergebnisse

Unter dem Aspekt der Mutationshypothese ist das Chromatin - wie in der Einleitung ausgeführt - als potentieller Zielort für Carcinogene anzusehen, da sich dort die molekularen Vorgänge der Replikation abspielen. Sowohl die DNA als Träger der genetischen Information, als auch die chromosomalen Proteine, denen Steuerungsfunktionen bei der Replikation und Transkription zugeordnet werden [46], könnten durch Bindung von Carcinogenen in ihrer Struktur und Funktion irreversibel verändert werden. Zwar zeigt das Carcinogen DAB eine erhöhte Bindungstendenz gegenüber dem nichtcarcinogenen AB an die Nukleinsäuren, diese erscheint jedoch nicht signifikant genug, um sie als Hinweis für eine bevorzugte Wechselwirkung zu akzeptieren, wie das im Sinne der Mutationshypothese erwartet werden sollte. Nach ihrer Reinigung enthielt die DNA keine über der Nachweisgrenze liegenden Anteile von gebundenen Azoderivaten. Dieser Befund spricht ebenfalls gegen starke Wechselwirkungskräfte des untersuchten Carcinogens mit der DNA und macht deshalb bleibende Strukturänderungen unwahrscheinlich. Dieses Ergebnis deckt sich allerdings nicht mit Aussagen anderer Autoren. Warwick und Roberts [47, 48] beschrieben, dass nach einmaliger Applikation von 660 $\mu\text{Mol/kg}$ DAB eine bleibende Bindung von 9 pMol/mg DNA der Rattenleber erfolgt. Dingmann und Sporn [49] sowie Brookes [50] fanden eine Korrelation zwischen Carcinogenität und Bindungsanteil an die DNA der Rattenleber

bei verschiedenen Azofarbstoffen, darunter auch DAB. In Übereinstimmung dazu fanden Chaveau et al. [22] für das DAB einen doppelt so hohen Bindungsanteil an der Rattenleber-DNA wie für das sehr schwache Carcinogen 2-Methyl-DAB. Abgesehen von anderen methodischen Unterschieden in der Versuchsdurchführung, hatten diese Autoren das Carcinogen DAB wesentlich höher dosiert, nämlich mehr als das dreissigfache der in dieser Arbeit verwendeten Dosis. Diese Befunde lassen sich deshalb schwer mit den in dieser Arbeit ermittelten Daten vergleichen. Es ist also zu vermuten, dass der Bindungsnachweis von DAB an die DNA nur bei sehr viel höheren Dosierungen geführt werden kann. Wegen der hohen spezifischen Aktivität des DAB schien jedoch eine solch hohe Dosierung bei der vorliegenden Arbeit biologisch nicht vertretbar.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen der Bindung von Azofarbstoffen an die chromosomalen Proteine waren die Befunde differenzierter. Nach elektrophoretischer Fraktionierung konnte an den Histonen, die 70 % der chromosomalen Proteine der Rattenleber ausmachen, weder gebundenes Carcinogen DAB noch nichtcarcinogenes AB gefunden werden. Im Gegensatz dazu enthielten die Nüchthistone - ihr Anteil an den chromosomalen Proteinen der Rattenleber beträgt 30 % - 12,4 pMol/mg¹⁾ bzw. 19,3 pMol/mg²⁾ gebundenes Carcinogen und kein oberhalb

1) Nach Einfachapplikation

2) Nach Zweifachapplikation

der Nachweisgrenze liegendes gebundenes nichtcarcinogenes AB. Die Nihthistone weisen jedoch DAB-Bindungs-Werte auf, die mindestens 50-fach ¹⁾ bzw. 80-fach ²⁾ über dem maximal möglichen Wert für das nichtcarcinogene AB liegen. Setzt man voraus, dass das Ausmass der Bindungsanteile mit der carcinogenen Wirkung korreliert werden kann, dann sollten die Nihthistone auf Grund dieser Befunde als Zielort für das Carcinogen DAB eine wesentliche Rolle bei der Tumorinduktion spielen. Den Nihthistonen werden neben den Histonen wichtige Funktionen bei der Steuerung der Genschaltung der Replikation zugeordnet [46]. Auf Grund der organ- und speziesspezifischen Variabilität der Nihthistone dürfte deren Funktion spezifischer sein, als die der Histone, die keine organ- und speziesspezifische Variation aufweisen. Ausserdem konnte wahrscheinlich gemacht werden, dass die Differenzierungsprozesse der Zelle von einer spezifischen Veränderung der Nihthistone begleitet sind [69, 70]. Schliesslich fanden Gronow et al. [71], eine Veränderung im Nihthistonbandenmuster nach Applikation von Carcinogenen (Gronow [71]) bzw. in Hepatomzellen (Lea [72]) bei Ratten. Auch diese Befunde unterstützen die Schlussfolgerung, dass durch die Bindung von Carcinogenen die Nihthistone so verändert

1) Nach Einfachapplikation

2) Nach Zweifachapplikation

werden könnten, dass sie in Sekundärprozessen die spezifische Informationsweitergabe des Genoms stören. Dadurch könnte ein wesentlicher Schritt zur Tumorgenese erfolgt sein.

Die Bindung von Carcinogenen an chromosomale Proteine wurde ebenfalls von einer Reihe von Autoren untersucht. Rees und Varcoe [51] isolierten aus Leberkernen von Ratten, denen oral DAB appliziert wurde, durch Säureextraktion Histone, die wesentliche Anteile an gebundenem DAB (120 pMol/mg Histon) enthielten. Albert und Warwick [24] fanden an den aus Rattenleberkernen mit Säure extrahierten Histonen 12 - 13 pMol DAB/mg, sowie 25 - 100 pMol/mg an den "sauren Proteinen", die aus dem "Residualkomplex" mit Na OH extrahiert wurden. Jungmann und Schweppe [23] fanden abweichend von Rees [51] und Albert [24] an den "sauren Proteinen" weniger Bindungsanteile (etwa zwei Drittel) als an den säureextrahierten Histonen. Die in der Literatur angegebenen Befunde über die Bindung von DAB an chromosomale Proteine ergeben ein widersprüchliches und von den Ergebnissen dieser Arbeit abweichendes Bild. Zwar können die Absolutwerte der Bindung wegen der sehr unterschiedlichen Dosierung von DAB nicht verglichen werden, jedoch sollte zumindest die Relation zwischen den Bindungsanteilen an den Histonen und denen der Nihthistone vergleichbar sein. Auch darin sind jedoch die Befunde von Rees und Varcoe [51] sowie Albert und Warwick [24] einerseits und Jungmann und Schweppe

[23] andererseits widersprüchlich. Diskutiert man aber die Literaturergebnisse in Hinblick auf die verwendeten Methoden, so muss festgestellt werden, dass sämtliche zitierte Autoren bei der Histon - Nichthistontrennung das Säureextraktionsverfahren [73, 74, 75, 76, 77] verwendeten. Bei diesem - bis heute immer noch häufig verwendeten - Verfahren werden Chromatin bzw. Zellkerne mit verdünnten Mineralsäuren (meistens etwa 0,2 N HCl oder H_2SO_4) behandelt, wobei die stark basischen Histone zum Teil in Lösung gehen. Aus dem präzipitierenden "Residualkomplex", der die Nukleinsäuren und vorwiegend saure Proteine enthalten soll, können dann die "sauren chromosomalen Proteine", die früher als Nichthistone definiert wurden, mit Na OH [73, 78], durch Phenolextraktion [79] oder SDS-Behandlung [76] von den Nukleinsäuren abgetrennt werden. Sonnenbichler und Nobis [17, 18, 20] konnten jedoch elektrophoretisch nachweisen, dass beim Säureextraktionsverfahren einerseits die lösliche Histonfraktion mit Nichthistonanteilen und andererseits die "sauren Proteine" mit wesentlichen Histonanteilen verunreinigt sind. Ausserdem entstehen durch Säurebehandlung am präzipitierenden Residualkomplex Artefakte, so dass nur bei stark denaturierenden Bedingungen (extrem hohe pH-Werte, SDS- bzw. Phenolextraktion) eine Ablösung der Restproteine möglich ist. Daraus sind auch die zum Teil sehr unterschiedlichen Angaben von verschiedenen Autoren über die Mengenverhältnisse von Histonen und Nichthistonen im Chromatin gleicher Organe und Spezies erklärbar. Wie schon erwähnt,

bedienten sich alle zitierten Autoren bei ihren Bindungsstudien von Carcinogenen an chromosomale Proteine ausschliesslich der Säureextraktionsmethode zur Histon-Nichthiston-trennung. Damit dürften auf Grund der dargelegten methodischen Fehlermöglichkeiten die quantitativen Bindungsverhältnisse von DAB und AB an Histonen und Nichthistonen nicht exakt beschrieben sein. Ausserdem isolierten Rees [51] und Jungmann [23] ihre Histone und Nichthistone direkt aus Zellkernen, ohne dazwischen geschaltete Chromatinisolierung, was eine stärkere Verunreinigung v.a. der Nichthistone mit Kernplasmaproteinen zur Folge haben könnte.

Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit versucht, die Bindung der Azofarbstoffe an chromosomale Bausteine mit Methoden zu untersuchen, die eine exakte analytische Zuordnung der Bindungsanteile ermöglichen. Dabei konnte im wesentlichen auf moderne Verfahren der Chromatinisolierung und -fraktionierung zurückgegriffen werden. Die Isolierung des Chromatins erfolgte modifiziert nach Zubay und Doty [80] aus Zellkernen, die nach der Methode von Dounce und Ickowitz [81] isoliert und gereinigt wurden. Anschliessend wurde das Chromatin in hohen Ionen- und Harnstoffkonzentrationen [60, 61, 62, 63, 64, 65] dissoziiert und die Trennung von chromosomalen Proteinen und Nukleinsäuren im CsCl-Dichtegradient durchgeführt.

Nach der quantitativen Trennung von Nukleinsäuren und Proteinen mussten schliesslich noch die Proteine selbst in Histone und

Nichthistone getrennt werden. Dabei wurde das bisher einzige quantitative Verfahren, die elektrophoretische Trennung auf Cellogel bei pH 10 nach Sonnenbichler und Machicao [82, 83], benutzt.

Die auf der Basis dieser Methoden durchgeführten quantitativen Bindungsstudien stimmen mit den bisherigen Literaturdaten nicht überein. Es wurde dargestellt, weshalb die Literaturangaben kritisch betrachtet werden müssen. Qualitativ fanden Rees [51] und Albert [24] zwar ähnliche Ergebnisse, d.h. hohe Bindungsanteile von DAB an den Nichthistonen wie an den Histonen. In der vorliegenden Arbeit mit besonderer Berücksichtigung der analytischen Methoden konnte jedoch gezeigt werden, dass der Bindungsanteil an den Nichthistonen erheblich (mindestens 50-fach) über dem für Histone maximal möglichen Wert liegt, wobei als maximal möglicher Wert die untere Nachweisgrenze angenommen wurde. Es bleibt offen, ob sich an den Histonen überhaupt Bindungsanteile nachweisen lassen. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse gilt als wahrscheinlich, dass die als Bindungspartner für das Carcinogen DAB identifizierten Nicht-histone eine Schlüsselrolle bei der Tumorerinduktion spielen.

5. Experimenteller Teil

5.1. Synthese der tritiummarkierten Azofarbstoffe

4-Dimethylaminoazobenzol (DAB) und 4-Aminoazobenzol (AB)

5.1.1. Darstellung und Reinigung der Ausgangsverbindungen

Die zur Synthese verwendeten Amine Anilin und Dimethylanilin wurden unmittelbar vor der Synthese unter Stickstoff destilliert. 5 g des Amins wurden in 100 ml wasserfreiem Äther gelöst. Durch die Lösung wurde fünf Std. lang getrocknetes HCl-Gas geleitet, wobei das Hydrochlorid ausfiel. Nach Abziehen des Äthers wurde das Hydrochlorid über Phosphor-pentoxid aufbewahrt.

5.1.2. Synthesegang

Eine Ampulle mit 125 mCi $\approx 13 \mu\text{Mol } ^3\text{H-}$ (ring-)markiertem Anilin¹⁾ (spez. Akt. 9,6 Ci/mMol) wurde zentrifugiert. Nach dem Öffnen wurde der Inhalt nach und nach mit 600 μl eiskalter 2,5 n HCl in einen 10 ml-Kolben gespült. Nach Zugabe von 22,1 mg ^1H -Anilin wurden unter Rühren innerhalb 15 Min. insgesamt 140 μl 3,3 M NaNO_2 -Lösung langsam dazugetropt, 30 Min. später 390 μl 3M Na-Acetatlösung und anschliessend 27,8 mg ^1H -Anilin zugegeben. Alle diese

1) Fa. Amersham-Buchler GmbH., Braunschweig, Werk England

Schritte erfolgten bei Eiskühlung des Kolbens und unter Stickstoff. Die gelbe Diazoaminobenzol-suspension wurde 7 Std. lyophilisiert. Zur Darstellung von AB und DAB wurden zwei parallele Ansätze hergestellt.

Das lyophilisierte Reaktionsgut wurde mit 1,5 mMol trockenem Aniliniumhydrochlorid bzw. Dimethylanilinium-hydrochlorid sowie 10 mMol Anilin/Dimethylanilin versetzt und 2 Std. bei 50° C unter Stickstoff gerührt. Nach Abkühlung im Eisbad wurden je 5 ml 2,5 n HCL zugegeben und nach 30 Min. Rühren mit einer Tauchfritte abgesaugt, anschliessend noch 2x mit 2 ml HCL gewaschen. Das schwerlösliche HCL-Salz der Azofarbstoffe wurde durch Zugabe von 3 mMol (ca. 340 mg) Na_2CO_3 und 5 ml Benzol/Äthanol (1:1) und 30 Min. Rühren der Suspension als Base freigesetzt. Die nun löslichen Azofarbstoffe wurden vom Niederschlag abfiltriert, der Rückstand mehrmals mit Benzol ausgespült, bis keine Gelbfärbung mehr zu sehen war, dann das Filtrat einrotiert. Nach Aufnahme in 1 ml Benzol wurde das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule (20 x 4 cm, Kieselgel 60, <230 mesh¹⁾) mit Benzol als Elutionsmittel gereinigt.

Als Identitätsnachweis und Reinheitstest wurden die RF-Werte von je drei Dünnschichtchromatogrammen (Kieselgel) in Benzol, CHCl_3 und CCl_4 als Laufmittel parallel mit Referenzsubstanz ermittelt. Ausserdem wurden UV-Spektren aufgenommen, die gleich-

1) Fa. Merck, Darmstadt

zeitig zur Konzentrations- und Ausbeutebestimmung verwendet wurden. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Packard-Flüssigkeitsszintillationszähler¹⁾. Damit konnte die Ausbeute an Radioaktivität, sowie die spez. Aktivität bestimmt werden. Die radiochemische Reinheit betrug bei beiden Syntheseprodukten mindestens 98 %.

Ausbeuten :

Substanz	Syntheseausbeute	Ausbeute an Radioaktivität	spez. Aktivität
AB	32,3 mg = 66 %	10,9 %	82,3 mCi/mMol
DAB	40,5 mg = 72 %	27 %	202,1 mCi/mMol

Die Syntheseprodukte wurden in Benzol in 2 m molarer Stammlösung im Kühlschrank aufbewahrt. Entsprechende Proben wurden einrotiert und in den jeweils angegebenen Konzentrationen in 1,2-Propandiol gelöst und injiziert.

5.2. In vivo-Applikation von DAB und AB

Alle verwendeten Tiere waren männliche Whistar-Ratten. Ihr Körpergewicht betrug 120 g $\pm$ 7 %. Zur Injektion wurden Proben von DAB und AB in 1,2-Propandiol gelöst. Die Konzentration betrug 0,1 - 1 m Ci/ml für DAB und 0,1 - 0,5 mCi/ml für AB. Es wurden zwischen 0,2 und 0,5 ml pro Injektion intraperitoneal (i.p.)

1) Packard-Tricarb-Liquidszintillation-Spektrometer,
Modell 3390.

appliziert. Zur Messung der zeitabhängigen Resorption (Teil 3.) wurden die radioaktiven Proben von DAB und AB durch Beimischen von nichtmarkiertem DAB bzw. AB auf eine spezifische Aktivität von 20 mCi/mMol gebracht. Davon wurden je 50 µCi pro Tier, gelöst in 0,5 ml 1,2-Propandiol, i.p. appliziert. Bei allen übrigen Experimenten wurde ^3H -DAB und ^3H -AB jeweils "unverdünnt" appliziert. Die Injektion erfolgte jeweils zur gleichen Tageszeit (zwischen 8.30 und 9.00), bei Experimenten mit Zweifachapplikation erfolgte die erste Injektion am Abend (15 Std.) vor der Aufarbeitung. Bei den Bindungsstudien im Teil 4. wurden jeweils 500 µCi $\approx$ 2,5 µMol DAB, sowie 200 µCi $\approx$ 2,5 µMol AB, jeweils gelöst in 0,5 ml 1,2-Propandiol pro Tier appliziert. Die Tiere wurden jeweils nach den im Text, den Tabellen und graphischen Darstellungen angegebenen Zeiten in Äthernarkose getötet, die Bauchhöhle sofort geöffnet, die Leber entnommen, in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und wie in Punkt 5.4. beschrieben, weiterverarbeitet.

5.3. Messung der radioaktiven Proben

Von farblosen und salzfreien Lösungen, die das auf gebundene Azofarbstoffe zu untersuchende Material enthielten, wurden Aliquots entnommen und in Polypropylenszintillatorfläschchen mit 10 - 12 ml "Dioxanszintillatorlösung" (8 g "Omnifluor"¹⁾, 120 g Naphtalin²⁾, gelöst in 200 ml Methanol²⁾, 40 ml Äthylenglykol²⁾ und 2 l Dioxan²⁾) versetzt.

1) 98 % PPO + 2% p-bis-(o-methylstyryl-)benzol, Fa. NEN, Boston, USA.

2) p.a. Substanzen der Fa. Merck, Darmstadt

Farbige Gewebeproben, Zellkerne, gefällte Proteine und Nukleinsäuren wurden zur Untersuchung der gebundenen Anteile an Azofarbstoffen nach dem Verfahren von Mahin und Lofberg [84] zubereitet. Maximal 100 mg Probensubstanz wurden mit 0,2 ml 70 %-iger HClO_4 und 0,4 ml 30 %-igem H_2O_2 in einem Glaszintillatorfläschchen fest verschlossen 2 Stunden auf 80°C erhitzt. Nach Abkühlen auf 0°C wurde mit 10 - 15 ml "Toluol-szintillatorlösung" (6 g $\text{PPO}^{1)}$ gelöst in 1 l Toluol²⁾ und 500 ml "Cellosol"²⁾ versetzt und anschliessend gezählt. Das Zählen wurde in einem Packardflüssigkeitsszintillationszähler³⁾ mit Quenchkontrolle und internem Standard durchgeführt. Zur Ermittlung der dpm-Werte wurde je eine Eichkurve für die verwendeten Toluol- und Dioxanszintillatorlösungen aufgenommen. Die Eichproben enthielten bekannte Mengen an ^3H -Toluol und waren an die Quenchbedingungen der Messproben adaptiert.

Alle nun folgenden Verfahren wurden, soweit nicht anders angegeben, zwischen 0°C und 4°C durchgeführt.

1) 2,5-Diphenyloxazol, Fa. NEN, Boston, U.S.A.

2) p.a. Substanzen der Fa. Merck, Darmstadt

3) Packard-Tricarb-Liquidszintillations-Spektrometer, Modell 3390

5.4. Isolierung von Zellkernen aus Rattenleber

Die Isolierung von Zellkernen erfolgte mit geringen Modifikationen nach der von Dounce und Ickovicz [81] beschriebenen Methode. Maximal wurden die Lebern von vier bis fünf Ratten gleichzeitig aufgearbeitet. Die Leber (6,5 bis 9 g) wurde mit der Schere in kleine Stücke geschnitten. Das zerkleinerte Gewebe wurde in einem Dounce-Homogenisator¹⁾ in 60 - 80 ml 11 %-iger Sucrose (0,32 M Sucrose, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris, pH 7,5) homogenisiert. Das Homogenat wurde durch Verbandsmull filtriert, das Filtrat 10 Minuten bei 800 g zentrifugiert (Christ, Minifuge²⁾). Die sedimentierten Kerne wurden in zwei bis drei ml 75 %iger Sucrose (2,2 M Sucrose, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris, pH 7,5) suspendiert und über 50 ml 75 %-igem Sucrosepuffer geschichtet, anschliessend 2 Std. bei 70.000 g ultrazentrifugiert (SW 30-Rotor, Christ Omega II-Zentrifuge²⁾). Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das gereinigte Sediment in 20 - 30 ml 11 %-iger Sucrose resuspendiert. Die Kerne wurden in einer Zählkammer³⁾ unter dem Lichtmikroskop gezählt und auf ihren Reinheitsgrad geprüft.

5.5. Präparation von Chromatin

Chromatin wurde nach der Methode von Zubay und Doty [80] präpariert. Die isolierten und gereinigten Kerne wurden in 30 ml

1) Fa. Braun, Melsungen

2) Fa. Christ, Osterode

3) Fa. Thoma, Frankfurt

EDTA-Puffer (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 50 mM Na_2SO_3 , 10 mM NaH_2PO_4 , pH 6.5) suspendiert und ultrabeschallt ¹⁾. Nach 10 Min. Zentrifugation bei 2000 g wurde das sedimentierte Chromatin noch 2 x mit je 20 ml EDTA-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Die Sedimente wurden jeweils im Lichtmikroskop auf Verunreinigung geprüft. Zur Verhinderung von Proteolyse [85] wurde anstelle von 50 mM Na_2SO_3 im EDTA-Puffer auch 10^{-4} M Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) [86] verwendet. Ein Aliquot des Chromatins wurde zur Analyse von DNA, RNA und Protein in H_2O gelöst.

5.6. Ultrazentrifugation von Chromatin

Die sedimentierten Chromatinfasern wurden in 5 M Harnstoff, 2 M NaCl, 50 mM Na_2SO_3 durch Homogenisieren und anschliessendes 1-2 stündiges, kräftiges Rühren gelöst. Die Lösung wurde 1 Stunde bei 4.000 g zur Sedimentation des restlichen ungelösten Materials zentrifugiert und der klare Überstand auf eine Konzentration von 250 - 350 $\mu\text{g/ml}$ (DNA) gebracht. Anschliessend wurde 36 - 40 Std. in einem W 40-Rotor bei 100.000 g ultrazentrifugiert ²⁾. Der Überstand wurde vorsichtig vom gelartigen Sediment abdekantiert. Das Sediment wurde nochmals in 5 M Harnstoff, 2 M NaCl, 50 mM Na_2SO_3 gelöst und ultrazentrifugiert. Von beiden Sedimenten wurden Proben zur Analyse von DNA, RNA und Protein in H_2O gelöst.

1) Modell Sonifier S 75, Fa. Bronson, Sonic Power, Danbury, U.S.A.

2) Fa. Christ, Osterode Ultrazentrifuge, Omega II

5.7. CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

Zur Ermittlung der Trennung : Nukleinsäuren/Protein im CsCl-Harnstoffdichtegradienten wurden Chromatinproben in 0,6 M CsCl, 5 M Harnstoff, 50 mM Na₂SO₃ gelöst. Durch Zugabe von festem CsCl wurden folgende CsCl-Molaritäten eingestellt : 1 M; 1,5 M; 2 M; 2,5 M; 3 M. Die Chromatinkonzentration betrug zwischen 50 µg und 225 µg DNA/ml. Nach Ermittlung der Trennkurven wurde in 2 M CsCl, 5 M Harnstoff, 50 mM Na₂SO₃ und bei Chromatinkonzentrationen von 120 - 175 µg DNA/ml gearbeitet. Die Chromatinlösungen wurden 1 Std. bei 4.000 g vorzentrifugiert, nicht gelöstes Material verworfen. Anschliessend wurde 70 Std. in einem SW-60-Rotor bei 50.000 rpm = ca. 350.000 g zentrifugiert ¹⁾. Zur Entleerung der Gradienten wurde vorsichtig von der Oberfläche her abpipettiert. In der Regel wurden 11 Fraktionen 0,5 ml entnommen. Die Nukleinsäuren befanden sich als Sediment am Gefässboden. Der Verlauf der Proteinverteilung im Gradienten wurde durch Tüpfeln auf Cellogel (siehe Punkt 5.9) durch Messen der Extinktionen bei 260 und 280 nm, sowie durch RNA- [87] und DNA [88]-Analysen bestimmt.

5.8. Isolierung der chromosomalen Proteine und Nukleinsäuren

Die vereinigten Überstände der NaCl-Ultrazentrifugation bzw. die proteinhaltigen Fraktionen des CsCl-Gradienten wurden unter mehrmaligem Wechsel des Mediums gegen H₂O dialysiert. Anschliessend wurden die Lösungen mit HCl angesäuert, kurz gerührt und zur

1) Ultrazentrifuge Omega II, Fa. Christ, Osteroda.

Ausfällung der Proteine mit dem 6-fachen Volumen Aceton versetzt. Die gefällten Proteine wurden 3 x mit einer Mischung Aceton : H₂O (6:1) und 3 x mit reinem Aceton gewaschen und anschliessend im Exsikkator getrocknet.

Die sedimentierten Nukleinsäuren wurden in 3 - 5 ml 0,2 M Na-Acetatlösung homogenisiert und anschliessend mit dem 6-fachen Volumen Alkohol ausgefällt.

5.9. Quantitative Analysen

Die DNA wurde nach der Methode von Dische [88], ausserdem durch UV-Messung (Extinktionsmaximum bei 260 nm; 18 OD bei 1 cm Schichtdicke entsprechen 1 mg/ml DNA), die RNA mit der Orcinmethode nach Meßbaum [87], bestimmt. Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Lowry [89], häufiger jedoch durch Töpfeln auf Cellogelelektrophoresestreifen, analog der Methode von Heil und Zillig [90] ermittelt (Färbung der Gelelektrophoresestreifen mit Amidol, Auflösen in Eisessig-TCA-Ameisensäure und E₆₃₀-Messung). Für die Analysen wurden Eichkurven mit Kalbsthymus-DNA¹⁾, RNA²⁾ und Serumalbumin²⁾ sowie mit säureextrahierten Histonen aus Kalbsthymuschromatin ermittelt. Es wurden jeweils Vierfach-Bestimmungen durchgeführt.

1) Fa. Sigma, San Louis, U.S.A.

2) Behring-Werke, Marburg/Lahn

5.10. Polyacrylamidgelelektrophoresen bei pH 2.7

Die Polyacrylamidelektrophoresen wurden nach der Methode von Panyim und Chalkley [85] durchgeführt. Man arbeitet mit 15%-igen Polyacrylamidgelen, der Gelpuffer enthält 2,5 M Harnstoff und 0,9 M Essigsäure (pH 2.7), der Elektrodenpuffer 0,9 M Essigsäure. Die Gele waren 10 - 12 cm lang und 0,5 cm im Durchmesser. Zur Polymerisation wurden folgende drei eiskalten, wässrigen Lösungen A, B und C im Verhältnis 1:4:3 gemischt :

Lösung A :	Eisessig	43,2 % (Vol)
	TEMED	4,0 % (Vol)
Lösung B :	Acrylamid	30,0 % (Gew.)
	N-, N'-Methylenbis-acrylamid	0,2 % (Gew.)
Lösung C :	Ammoniumperoxodisulfat	0,2 % (Gew.)
	Harnstoff	39,9 % (Gew.)

Nach dem Mischen wurde ca. 10 Min. im Wasserstrahlvakuum entgast, in die Gelröhrchen gefüllt und vorsichtig mit einigen Tropfen Wasser überschichtet. Die Polymerisation erfolgte bei Zimmertemperatur und dauerte ca. 2 Std. Anschliessend wurde zur Entfernung der TEMED- und Peroxid-Ionen über Nacht bei 80 V vorelektrophoretisiert. Die Proteinproben wurden zum Auftragen in einer Konzentration von 10 - 25 mg/ml in 1%-iger Essigsäure, 8 M Harnstoff und 1 % β -Mercaptoäthanol bei 37° C gelöst. Es wurden Proben von 50 - 500 μ g Protein in maximal 0,2 ml aufgetragen, anschliessend 4 - 6 Std. bei 150 V und 1,2 - 1,5 mA pro Röhrchen elektrophoretisiert. Die Gele wurden aus den Röhrchen

vorsichtig herausgelöst, 15 Min. mit Amidoschwarz (0,5 % Amidoschwarz in 7%-iger Essigsäure) oder 30 Min. mit Coomassie brilliant blue¹⁾ (0,5 % in 70 % Essigsäure) angefärbt, anschließend in 7 % Essigsäure mehrere Tage entfärbt. Die Gele wurden im UV-Spektrometer²⁾ bei 630 nm densitometriert.

5.11. Quantitative Bestimmung des Histon- und Nichthistonanteils im Rattenleberchromatin

Die Bestimmung des Histon- und Nichthistonanteils erfolgte nach der von Machicao und Sonnenbichler [91] für chromosomale Proteine ausgearbeiteten Methode der elektrophoretischen Trennung auf Cellogel. Von Lösungen der Gesamtproteine mit einer Konzentration zwischen 20 - 40 mg/ml wurden 1 - 2 µl auf 17 cm langen Cellogelstreifen³⁾ aufgetragen. Die Streifen wurden vor dem Auftragen im "pH 10-Puffer" (0,6 M Ammoniumborat, 10 mM EDTA, 10 mM β-Mercaptoäthanol, 6 M Harnstoff, pH 10 - mit 25%-iger Ammoniaklösung eingestellt) äquilibriert, dann vorsichtig auf eine gekühlte, Teflon-beschichtete Kammer aufgelegt. Die Elektrophorese lief 15 Min. bei einer Feldstärke von 60 V/cm und einer Stromstärke von 25 mA. Die Histone wanderten in dieser Zeit ca. 1 cm vom Start aus zur Kathode, die Nichthistone zur Anode. Die Streifen wurden 5 Min. mit 0,5 % Amidoschwarz in 10 % Eisessig, 45 % Methanol, 45 % H₂O,

1) Fa. Serva, Heidelberg

2) Gilford-Instruments, Laboratories, Inc., Oberlin Ohio, U.S.A.

3) Chemetron, Mailand, Italien

gefärbt und anschliessend in dieser Lösung, ohne Farbstoff, über Nacht entfärbt. Die gefärbten Banden wurden ausgeschnitten und die Histon- und Nihthistonanteile durch Auflösen in 3 ml 80 % Essigsäure, 10 % Ameisensäure und 10 % TCA und Messen der Extinktionen bei 630 nm bestimmt. Als Blindwert diente ein gleichartig behandeltes leeres Gelstück. Die Summe der gemessenen Extinktionen wurde gleich 100 % gesetzt. Dabei muss berücksichtigt werden, dass Nihthistone wegen ihrer geringen Basizität weniger Amidoschwarz binden [92]. Der Korrekturfaktor beträgt 1,69. Bei einer Elektrophoresedauer von ca. 1 Std. bei 60 V/cm werden die Histone ausserdem in sämtliche fünf Banden in folgender Reihe (vom Start aus) zerlegt : H2B, H3, H2A, H4 und H1 [91]. Das Verfahren konnte somit neben der Acrylamidgelelektrophorese auch zur Charakterisierung der Histone verwendet werden.

5.12. Präparative Trennung von Histonen und Nihthistonen auf Cellogel

Zur präparativen Trennung der chromosomalen Gesamtproteine wurde das von Machicao und Sonnenbichler [82, 83] zur präparativen Histonfraktionierung entwickelte Verfahren verwendet : 15 - 20 mg Proteinproben gelöst in 250 - 350 µl wurden auf Cellogel-Platten¹⁾ aufgetragen (2,5 mm Schichtdicke). Die Elektrophorese lief bei einer Feldstärke von 12,5 V/cm und einer Stromstärke von 100 mA. Der Verlauf der Elektrophorese wurde durch Abdruck auf Dünnschichtcellogelstreifen, die anschliessend gefärbt

1) Chemetron, Mailand, Italien

wurden, kontrolliert. Nach 5 Std. waren die Nihthistone ca 1,5 cm zur Anode gewandert. Das Gelstück mit dem Nicht-histonanteil wurde neben der Startlinie abgeschnitten. Anschließend lief die Elektrophorese 15 Std. weiter, danach waren die Histone in vier Fraktionen : H2B, H3 + H2A, H4 und H1 getrennt. Die Banden wurden ausgeschnitten, die Streifen zerkleinert und in Aceton (30 - 40 ml pro Bande) aufgelöst. Die Proteine fallen dabei aus. Durch anschliessendes dreimaliges Waschen mit Aceton/ 0,2 n HCl (6:1) wurden Verunreinigungen mit Borsäure entfernt und nach zweimaligem Waschen mit Aceton die Proteine getrocknet. Die Ausbeuten an Protein betrugen 80 %. Ihre Reinheit wurde elektrophoretisch in Polyacrylamidgelen überprüft.

5.13. Trennung von Histonen und Nihthistonen Über QAE-Sephadex

Die chromosomalen Gesamtproteine wurden nach der von Gilmour und Paul [60, 68] beschriebenen Methode chromatographiert. 60 mg Gesamtprotein wurden in 3 ml "Harnstoffpuffer" (5M Harnstoff, 10 mM Tris 1 % β -Mercaptoäthanol, pH 8,3) gelöst. 5 g QAE-Sephadex¹⁾ wurden im selben Puffer äquilibriert und in eine 30 x 2 cm-Säule gefüllt. Die Proteinlösung wurde aufgetragen und die Histone mit dem "Harnstoffpuffer" eluiert. Anschliessend wurden die Nihthistone, die vom Ionenaustauscher zurückgehalten werden, durch einen Salzpuffer (2 M NaCl, 5 M Harnstoff, 10 mM Tris, pH 8.3) von der Säule abgelöst.

1) Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden

Der Proteingehalt der eluierten Fraktionen wurde durch Messen der UV-Extinktion bei 230 nm ermittelt. Die Histone wurden direkt aus dem Eluat, die NICHTHISTONE nach Dialyse bei U^0 C gegen 50 mM Sulfatlösung mit Aceton gefällt und durch Polyacrylamidgelelektrophorese auf ihren Reinheitsgrad getestet.

5.14. Fraktionierung der Histone über Biogel P60

Die über QAE-Sephadex abgetrennten Histone wurden nach der Methode von Böhm et al. [93] über Biogel P60¹⁾ fraktioniert. 25 mg Histone wurden in 2ml 8 M Harnstoff, 1 % Essigsäure, 1 % β -Mercaptoäthanol gelöst. Biogel P60¹⁾ wurde im Salzpuffer (0,5 % NaCl, 20 mM HCl, 0,02 % NaN_3 , pH 1,7) äquilibriert und in eine 30 x 2,5 cm Säule gefüllt. Nach Auftragen der Histonlösung wurde mit demselben Salzpuffer eluiert, und in 5 ml Fraktionen gesammelt. Durch Messen der UV-Extinktionen bei 230 nm wurde der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen ermittelt, wobei drei getrennte Fraktionen H1 + H2A; H3 und H2B + H4 erhalten wurden. Die Identifizierung und Reinheitsprüfung erfolgte nach Acetonfällung auf Polyacrylamidgelen.

1) Fa. Bio-Rad Laboratories, Californien, U.S.A.

5.15. Reinigung der DNA

Die aus den Sedimenten der Ultrazentrifugation bzw. CsCl-Dichtegradientenzentrifugation mit Alkohol gefällten Nukleinsäuren wurden modifiziert nach der Methode von Marmur [94] in "SSC-Puffer" (0,15 M NaCl, 15 mM Na-Citrat, pH 8.5) in einer Konzentration von 0,3 mg/ml gelöst. Zu ca. 80 ml dieser Lösung wurden 5 mg RNA-ase¹⁾, gelöst in 5 ml "SSC-Puffer", gegeben. Die RNA-ase-Lösung war zuvor, zur Inaktivierung möglicher DNA-ase-Verunreinigungen, 60 Min. auf 80° C erhitzt worden. Die Inkubation mit der RNA-ase erfolgte 60 Min. bei 37° C. Anschliessend wurde derselbe Ansatz mit 8 mg Pronase²⁾, gelöst in 5 ml "SSC-Puffer", ebenfalls 60 Min. bei 37° C inkubiert, und anschliessend die DNA mit Alkohol gefällt und 3 x gewaschen.

1) Ribonuklease A aus Rinderpankreas, Fa. Sigma, San Louis, USA.

2) Proteinase K aus Pilzen, Fa. Merck, Darmstadt.

6. Zusammenfassung

Bei der Tumorinduktion muss nach heutigem Kenntnisstand der Informationsfluss in der Zelle irreversibel gestört werden. Dies könnte durch Aktivierung onkogener Viren oder durch Wechselwirkung des Genmaterials mit exogenen Noxen geschehen. Es war Ziel dieser Arbeit, molekulare Vorgänge bei der durch exogene Noxen verursachten Tumorgenese zu untersuchen. Dazu wurden Bindungsstudien des carcinogenen Azofarbstoffes 4-Dimethylaminobenzol (DAB) an chromosomale Bausteine durchgeführt. Um die Relevanz der erhaltenen Ergebnisse abschätzen zu können, wurde parallel zu den Untersuchungen mit dem Carcinogen 4-Dimethylaminoazobenzol (DAB), das chemisch sehr verwandte aber carcinogen inaktive 4-Aminoazobenzol (AB) eingesetzt.

Um bei den Untersuchungen möglichst differenzierte Ergebnisse zu erhalten, wurden die beiden Azofarbstoffe DAB und AB mit hoher spezifischer radioaktiver Markierung dargestellt. Die Synthese wurde durch Diazotierung des ^3H -(ring-) markierten Anilins und anschließender Kupplungsreaktion zum Azofarbstoff durchgeführt. Dieser Weg führte zu einem Syntheseprodukt, das die ^3H -Atome nur am monosubstituierten Phenylring enthält, der beim Metabolismus und bei Reaktionen mit biologischem Material nicht substituiert wird. Dadurch waren bei den folgenden Bindungsstudien quantitative Korrelationen möglich.

Zur Ermittlung optimaler Applikationsbedingungen wurde anschliessend der zeitliche Verlauf der Resorption der beiden Azofarbstoffe einschliesslich ihrer Metaboliten im Erfolgsorgan sowie in den Zellkernen und im Chromatin bestimmt. Der Verlauf der Resorption ergab in allen drei Fraktionen ein analoges Bild, das Carcinogen DAB und das nichtcarcinogene AB zeigen deutliche Unterschiede : Die Resorption des nichtcarcinogenen AB verläuft jeweils kontinuierlich mit abnehmender Zeit. Im Gegensatz dazu verläuft die Resorption des Carcinogens DAB diskontinuierlich mit einem Maximum der DAB-Konzentration zwischen der vierten und fünften Stunde nach der Applikation. Dieses Maximum war trotz der Schwankungen der Einzelwerte so signifikant, dass dieser Zeitpunkt bei den folgenden Untersuchungen ebenfalls maximale Bindungsanteile erwarten liess.

Als zentrale Problemstellung wurde anschliessend die Bindung der Azofarbstoffe DAB und AB an die chromosomalen Bausteine untersucht. Darüber liegen bereits eine Vielzahl von Untersuchungen vor, die jedoch einer kritischen Überprüfung bedürfen, da bei der Chromatinfractionierung ausschliesslich Methoden verwendet wurden, die nach heutigem Kenntnisstand keine quantitativen Trennverfahren sind. In dieser Arbeit wurde deshalb besonders auf exakte Trennung und Reinheit der zu untersuchenden Chromatinfractionen geachtet. Im wesentlichen konnte dabei auf moderne Methoden der Chromatinfractionierung zurückgegriffen werden.

Ergänzend musste jedoch ein Verfahren zur quantitativen Trennung von chromosomalen Proteinen und Nukleinsäuren ausgearbeitet werden. Diese Trennung konnte erzielt werden, indem man Chromatin in 2M CsCl und 5M Harnstoff dissoziierte und anschliessend 70 Std. bei 350.000 g ultrazentrifugierte. Dabei bildet sich ein Dichtegradient, wobei die Proteine in die mittleren Fraktionen, die Nukleinsäuren hingegen ins Sediment wandern. Die Chromatinkonzentration muss dabei $<175 \mu\text{g/ml}$ (bez. auf DNA) betragen, andernfalls wandern Proteinanteile ins Nukleinsäuresediment.

Die auf der Basis quantitativer Fraktionierungsmethoden durchgeführten Bindungsstudien ergaben an der DNA nach deren Reinigung keine Bindung von Azofarbstoffen. Dieser Befund steht im Widerspruch zu Ergebnissen anderer Autoren, kann jedoch durch deren wesentlich höhere Dosierung (mehr als die dreissigfache Dosis) erklärt werden.

Die Untersuchungen der Bindung der Azofarbstoffe an den chromosomalen Proteinen ergaben ein differenzierteres Bild. An den Histonen konnten weder gebundenes Carcinogen DAB noch Nichtcarcinogen AB nachgewiesen werden. Dagegen fand sich an den Nichthistonen ein deutlicher Bindungsanteil des Carcinogens DAB von $12,4 \text{ pMol/mg}^{1)}$ bzw. $19,3 \text{ pMol/mg}^{2)}$. Dieser Wert liegt mindestens fünfzigfach¹⁾ bzw. achzigfach²⁾ über dem für Histone maximal möglichen. Ausserdem konnte für das nicht carcinogene AB keine über der Nachweisgrenze liegende Bindung an den Nichthistonen gefunden werden. Auf Grund der vorangegangenen Isolierungsschritte muss für die Art der

1) Nach Einfachapplikation

2) Nach Zweifachapplikation

Wechselwirkung carcinogenes DAB - Nihthistonprotein eine kovalente Bindung diskutiert werden. Als Ergebnis dieser Arbeit darf somit festgestellt werden, dass die Nihthistone als Bindungspartner für das Carcinogen DAB identifiziert werden konnten. Daraus lässt sich aber folgern, dass durch die Bindung von Carcinogen eine Strukturänderung der Nihthistone erfolgt, die sich im Sekundärprozess mutagen auswirken könnte, da den Nihthistonen wichtige Stauerungsfunktionen bei den molekularen Prozessen der Replikation und Transkription zugeordnet werden. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse gilt als wahrscheinlich, dass die als Bindungspartner für das Carcinogen DAB identifizierten Nicht-histone eine Schlüsselrolle bei der Tumorinduktion spielen.

. Literaturverzeichnis

- 1) P. Pott, Chirurgical observations relative to the Cancer of Scrotum, London 1775, Reprinted in Natl. Cancer Inst. Monograph 10, 7-13 (1963)
- 2) R. v. Volkmann, Berlin, Klin. Wochenschrift 11, 218-232 (1874)
- 3) K. Yamagiwa, K. Ichikawa, Experimentelle Studie über die Pathogenese der Epithalgeschwulste, Mitt. Med. Fak. Tokio 15, 295-344 (1915)
- 4) K. Yamagiwa, K. Ichikawa, Experimental Study of the Pathogenesis of Carcinoma, J. Cancer Res. 3, 1-29 (1918)
- 5) K.H. Bauer, in : Das Krebsproblem, Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1963)
- 6) H. C. Pitot, C. Heidelberger, Canc. Res. 23, 1694-1700 (1963)
- 7) H. Marquardt, F.K. Zimmermann, H. Dannenberg, H.G. Neumann, A. Bodenberger, M. Metzler, Z. Krebsforschung 74, 412-433 (1970)
- 8) H. Marquardt, Naturwiss. Rdsch. 21, 52-57 (1968)
- 9) V. Wunderlich, M. Schütt, M. Böttger, A. Graffi, Biochem. J. 118, 99-109 (1970)
- 10) V. Wunderlich, Arch. Geschwulstforschung 1969-1970 (Publ.1971), 38, 310-326
- 11) E. Hecker, in : H.E. Bock, U. Dold (Hrsg.) Krebsforschung und Krebsbekämpfung, 6, 77-96, München-Berlin-Wien : Urban und Schwarzenberg (1967)
- 12) E. Hecker, Z. Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.) 18, 978-988 (1968)

- 13) E. Hecker, Z. Krebsforsch. 78, 99-122 (1972)
- 14) K. Munck, Z. Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.) 18, 973-978 (1968)
- 15) R.J. Huebner, G.P. Todaro, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 64, 1087-1094 (1969)
- 16) H.M. Temin, J. Nat. Cancer Inst. 46, II-VII (1971)
- 17) J. Sonnenbichler, G.W. Bornkamm, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1579-1588 (1967)
- 18) J. Sonnenbichler, P. Nobis, Europ. J. Biochem. 16, 60-65 (1970)
- 19) J. Sonnenbichler, P. Nobis, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1556-1566 (1968)
- 20) P. Nobis, Dissertation, Universität München 1972
- 21) J. Sonnenbichler, Naturwiss. 61, 317-324 (1974)
- 22) J. Chauveau, M. Meunier, A. Benoit, Int. J. Cancer, 1-8 (1974)
- 23) R.A. Jungmann, J.S. Schweppe, Canc. Res. 32, 952-959 (1972)
- 24) A.E. Albert, G.P. Warwick, Chem.-Biol. Interactions, 5, 61-64 (1972)
- 25) L.A. Poirier, J.A. Miller, E.C. Miller, K. Sato, Cancer Res. 27, 1600-1613 (1967)
- 26) J.D. Scribner, J.A. Miller, E.C. Miller, Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 560-565 (1965)
- 27) J.K. Lin, J.A. Miller, E.C. Miller, Biochemistry 7, 1889-1895 (1968)
- 28) J.K. Lin, J.A. Miller, E.C. Miller, Biochemistry 8, 1573-1582 (1969)
- 29) E.C. Miller, J.A. Miller, M. Enomoto, Can. Res. 24, 2018-2026 (1964)
- 30) J.A. Miller, Canc. Res. 30, 559-576 (1970)

- 31) C.M. Goodall, S. Gasteyer, Nature 211, 1422-1422 (1966)
- 32) C.M. King, H.R. Gutmann, S.F. Chang, J. Biol. Chem. 238, 2199-2205 (1965)
- 33) P.H. Grantham, E.K. Weisburger, J.H. Weisburger, Biochim. Biophys. Acta 107, 414-424 (1965)
- 34) E.C. Miller, U. Juhl, J.A. Miller, Science 153, 1125-1127 (1966)
- 35) R.A. Andersen, M. Enomoto, E.C. Miller, J.A. Miller, Canc. Res. 24, 128-140 (1964)
- 36) R.W. Baldwin, W.R.D. Smith, Brit. J. Cancer 19, 433-443 (1965)
- 37) K. Sato, L.A. Poirier, J.A. Miller, E.C. Miller, Canc. Res. 26, 1678-1687 (1966)
- 38) P.D. Lotlikar, J.D. Scribner, E.C. Miller, Life Sci. 5, 1263-1269 (1966)
- 39) E.V. Jensen, H.I. Jacobson in : Biological Activities of Steroids in Relation to cancer (Academic Press, New York, 1960), 161-178
- 40) E.V. Jensen, D.J. Hurst, E.R. de Sombre, P.W. Jungblut, Science, 158, 385-387 (1967)
- 41) N.C. Yang, A.J. Castro, M. Lewis, Ting-Wa-Wong, Science 134, 386-387 (1961)
- 42) Ch. Huggins, N.C. Young, Science 137, 257-262 (1962)
- 43) H. Dannenberg, Zeitschr. für Krebsforsch. 65, 396-403 (1963)
- 44) H. Dannenberg, J. Sonnenbichler, Zeitschr. für Krebsforschung 67, 127-134 (1965)
- 45) H. Dannenberg, J. Brachmann, C. Thomas, Zeitschr. für Krebsforschung 71, 74-80 (1968)
- 46) L.S. Hnilica, in : The Structure and Biological Functions of Histones. Cleveland, Ohio, CRC Press (1972)
- 47) J.J. Roberts, G.P. Warwick, Int. J. Canc. 1, 179-196 (1966)

- 48) G.P. Warwick, J.J. Roberts, Nature 213, 1206-1207 (1967)
- 49) C.W. Dingman, M.B. Sporn, Canc. Res. 27, 938-944 (1967)
- 50) P. Brookes, P.D. Lawley, Nature 202, 781-784 (1964)
- 51) K.R. Rees, J.S. Varcoe, Brit. J. Canc. 21, 174-177 (1967)
- 52) M. Sluyser, Biochim. Biophys. Acta 154, 606-609 (1968)
- 53) E.J. Barry, C.A. Ovechka, H.R. Gutmann, J. Biol. Chem. 243,
51-60 (1968)
- 54) P.D. Lotlikar, W.K. Paik, Biochem. J. 124, 443-445 (1971)
- 55) E.J. Barry, C.A. Ovechka, H.R. Gutmann, J. Biol. Chem. 243,
51-60 (1968)
- 56) M. Kodama, Y. Tagashira, C. Nagata, J. Biochem. 64, 81-86 (1968)
- 57) R.L. O'Brien, R. Stanton, R.L. Craig, Biochim. Biophys. Acta 186,
414-417 (1969)
- 58) P.D. Lotlikar, W.K. Paik, Biochem. J. 124, 443-445 (1971)
- 59) E.W. Small, A.M. Craig, J. Isenberg, Biopolymers 12, 1149-1160
(1973)
- 60) R.S. Miller, J. Paul, FEBS Letters 9, 242-244 (1970)
- 61) A.J. McGillivray, D. Carroll, J. Paul, FEBS Letters 13,
204-208 (1971)
- 62) E. Schiltz, C.E. Sekeris, Experientia 27, 30-39 (1970)
- 63) H.H. Ohlenbusch, B.M. Olivera, D. Tuan, N. Davidson, J. Mol.
Biol. 25, 289-315 (1967)
- 64) E. Frederico, C. Houssier, Europ. J. Biochem. 1, 51-60 (1967)
- 65) C.F. Crampton, R. Lipshitz, E. Chargaff, J. Biol. Chem. 206,
499-510 (1954)

- 66) J. Vinograd, J.E. Hearst, Fortschr. der Chem. org. Naturstoffe 20, 373-422 (1962)
- 67) W. Szybalski, E.H. Szybalski, Proc. Nucl. Acid Res. 2, 311-354 (1971)
- 68) R.S. Gilmour, J. Paul, J. Mol. Biol. 40, 137-139 (1969)
- 69) F. Chytil, T.C. Spelsberg, Nature, New Biol. 233, 215-218 (1971)
- 70) F. Chytil, S.R. Glaser, T.C. Spelsberg, Fed. Proc. 31, 418-418 (1972)
- 71) M. Gronow, T.M. Thackrah, Chem.-Biol. Interactions 9, 225-236 (1974)
- 72) M.A. Lea, M.R. Koch, H.P. Morris, Canc. Res. 35, 1693-1697 (1975)
- 73) J. Bonner, G.R. Chalkley, M. Dahmus, D. Frambrough, F. Fujimura, R.C.C. Huang, J. Huberman, R. Jensen, K. Marushige, H. Ohlenbusch, B. Olivera, J. Widholm, Meth. in Enzymol. Vol. XII, 3-65 (1968)
- 74) T.C. Spelsberg, L.S. Hnilica, Biochim. Biophys. Acta 228, 202-211 (1971)
- 75) K. Marushige, J. Bonner, J. Mol. Biol. 15, 160-174 (1966)
- 76) K. Marushige, D. Brutlag, J. Bonner, Biochemistry 7, 3149-3155 (1968)
- 77) D.Y.H. Tuan, J. Bonner, J. Mol. Biol. 45, 59-76 (1969)
- 78) W. Benjamin, A. Gelhorn, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 59, 262-268 (1968)
- 79) E. Vinnela, J.D. Algranati, S. Ochoa, Europ. J. Biochem. 1, 3-11 (1967)
- 80) G. Zubay, P. Doty, J. Mol. Biol. 1, 1-20 (1959)
- 81) A.L. Dounce, R. Ickowicz, Arch. Biochem. Biophys. 131, 359-368 (1969)
- 82) F. Machicao, J. Sonnenbichler, Microbios 13, 225-230 (1975)
- 83) J. Sonnenbichler, F. Machicao, J. Zetl, Methods in Cell Biol. 14, inpress (1976)
- 84) J.T. Mahin, R.T. Lofberg, Analyt. Biochem. 16, 500-509 (1966)

- 85) S. Panyim, R. Chalkley, Arch. Biochem. Biophys. 130, 337-346 (1969)
- 86) L.D. Nooden, H.W. van den Broeck, J.S. Servall, FEBS Letters 29,
326-328 (1973)
- 87) W. Meßbaum, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 258, 117-120 (1939)
- 88) Z. Dische, Mikrochemie 8, 4-32 (1930)
- 89) O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall, J. Biol.
Chem. 139, 265-275 (1951)
- 90) A. Heil, W. Zillig, FEBS Letters 11, 165-168 (1970)
- 91) F. Machicao, J. Sonnenbichler, Biochim. Biophys. Acta 236,
360-361 (1971)
- 92) J. Sonnenbichler, I. Zetl, F. Machicao, Analyt. Biochem. 64,
74-79 (1975)
- 93) E.L. Böhm, W.N. Strickland, M. Strickland, B.H. Thwaits,
R.D. van der Westhuizen, C. von Holt, FEBS Letters 34,
217-221 (1973)
- 94) J. Marmur, J. Mol. Biol. 3, 208-218 (1961)

L e b e n s l a u f
=====

26.12.1942	geboren in München
1948 - 54	Besuch der Volksschule in St. Mang bei Kempten
1954 - 64	Besuch des Humanistischen Gymnasiums, bis 1958 in St. Ottilien, anschliessend in Kaufbeuren mit abschliessendem Abitur.
ab WS 1964/65	Studium an der Universität München, zuerst sechs Semester Chemie und Sport, Fachrichtung Lehramt, anschliessend Studium der Chemie, Fachrichtung Diplom.
Oktober 1968	Diplom-Vorprüfung in Chemie
Februar 1972	Diplom-Hauptprüfung in Chemie
1972 - 75	Tätigkeit am Max-Planck-Institut für Biochemie in München, bis 1973 als Diplomand, anschliessend als Doktorand
1.8.1975 - 1.2.1977	Referendarzeit als Lehrer für Chemie und Physik in Bremen mit abschliessendem Staatsexamen
Seit 1.2.1977	Lehrer für Chemie und Physik in Bremen.

